

Aus dem Institut für Physiologie und Pathophysiologie
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Genetische Ursachen des Langen-QT-Syndroms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Maren Limberg
geboren am 03.05.1983 in Emden

Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 18.04.2011 (Tag der Disputation).

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Niels Decher, Universität Marburg

Koreferent: Prof. Dr. Grzeschik, Universität Marburg

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	9
1.1 IONENSTRÖME DES KARDIALEN AKTIONSPOTENTIALS	9
1.2 DAS LANGE-QT-SYNDROM	11
1.3 DIE ROLLE DES KVLQT1-KALIUMKANALS IM HERZEN (LQT1)	15
1.4 DIE ROLLE DES HERG-KALIUMKANALS IM HERZEN (LQT2)	17
1.5 DIE ROLLE DES NAV1.5-NATRIUMKANALS IM HERZEN (LQT3)	19
1.6 DIE ROLLE DES KIR2.1-KALIUMKANALS IM HERZEN (ANDERSEN-SYNDROM)	21
2. ZIELE DER ARBEIT	24
3. MATERIALIEN UND METHODEN	25
3.1 MATERIALIEN	25
3.2 BAKTERIENSTÄMME	27
3.3 PLASMIDE	27
3.4 OLIGONUKLEOTIDE	28
3.5 MEDIEN UND ANZUCHTVERFAHREN	29
3.6 MOLEKULARBIOLOGISCHE UND GENETISCHE METHODEN	29
3.6.1 <i>Plasmidisolierung aus Bakterien im kleinen Maßstab - Minipräparation</i>	29
3.6.2 <i>Plasmidisolierung aus Bakterien im großen Maßstab - Midipräparation</i>	29
3.6.3 <i>Elektrophoretische Auftrennung von DNA</i>	29
3.6.4 <i>Restriktionsverdau</i>	30
3.6.5 <i>Ligation</i>	30
3.6.6 <i>Transformation</i>	30
3.6.7 <i>Elektroporation</i>	31
3.6.8 <i>PCR</i>	31
3.6.9 <i>Touchdown-PCR</i>	32
3.6.10 <i>Nested-PCR</i>	32
3.6.11 <i>Aufreinigung von PCR-Produkten</i>	32
3.6.12 <i>Sequenzierung</i>	32
3.6.13 <i>Einführung von Punktmutationen mittels ortsgerichteter Mutagenese</i>	33
3.6.14 <i>Hybrid-Minigen-System</i>	33
3.6.15 <i>In vitro Transkription</i>	34
3.6.16 <i>Lithium-Chlorid-Präzipitation der cRNA</i>	35
3.6.17 <i>RNA-Quantifizierung</i>	35
3.6.18 <i>Quantifizierung der Oberflächenexpression von Proteinen</i>	36
3.6.19 <i>Einzelstrangkonformationsanalyse</i>	36
3.7 BIOCHEMISCHE METHODEN UND ANALYTISCHE METHODEN	38
3.7.1 <i>DNA-Isolation aus EDTA-Blut</i>	38
3.7.2 <i>Silberfärbung</i>	39
3.8 ELEKTROPHYSIOLOGIE	39
3.8.1 <i>Injektion von cRNA in Xenopus laevis Oozyten</i>	39
3.8.2 <i>Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an Xenopus laevis Oozyten</i>	40
3.9 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	41
3.9.1 <i>Zellkulturen</i>	41
3.9.2 <i>Passagieren von Zellkulturen</i>	41
3.9.3 <i>Transiente-Transfektion</i>	42
3.9.4 <i>Immunocytochemie</i>	42
3.10 FLUORESZENZMIKROSKOPIE	43
3.10.1 <i>Mikroskopie der Zellen</i>	43
3.11 STATISTISCHE AUSWERTUNGEN	43
3.11.1 <i>Zweiseitiger T-Test</i>	43

3.11.2	Kopplungsungleichgewicht „linkage disequilibrium“	43
4.	ERGEBNISSE	45
4.1	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MUTATIONEN BEI MARBURGER PATIENTEN	45
4.1.1	Identifizierung der H1153Y-Mutation im Exon 15 des KCNH2-Gens (Patient 041)	46
4.1.1.1	Lokalisation der H1153Y-Mutation im hERG-Kaliumkanal	49
4.1.1.2	Funktionelle Charakterisierung der H1153Y-Kanalvariante in <i>Xenopus</i> Oozyten	49
4.1.1.3	Oberflächenexpression des hERG H1153Y-Kanals in <i>Xenopus</i> Oozyten	52
4.1.1.4	Transport der hERG-Kanäle an die Zellmembran	53
4.1.2	Identifizierung der G269S-Mutation im Exon 6 des KCNQ1-Gens (Patient 010)	55
4.1.2.1	Lokalisation der G269S-Mutation im KvLQT1-Kanal	57
4.1.2.2	Funktionelle Charakterisierung der G269S-Kanalvariante in <i>Xenopus</i> Oozyten	58
4.1.3	Identifizierung des H558R- und des IVS9-3-C>A-Polymorphismus im Exon 12 und Intron 9 des SCN5A-Gens (Patient 040)	61
4.1.3.1	Lokalisation des H558R-Polymorphismus im Nav1.5-Natriumkanal	63
4.1.3.2	Genetische Kopplung des H558R- und IVS9-3-C>A-Polymorphismus	63
4.1.3.3	Auswirkungen des intronischen IVS9-3-C>A-Polymorphismus auf das Spleißing des Natriumkanals	65
4.1.3.4	Funktionelle Charakterisierung der H558R-Kanalvariante in <i>Xenopus</i> Oozyten	67
4.2	CHARAKTERISIERUNG EINER NEUEN LQT-FORM	72
4.2.1	Lokalisation der N318S- und W322C-Mutation im Kir2.1-Kanal	72
4.2.2	Konservierung der N318S- und W322C-Mutation innerhalb der Kir-Familie	73
4.2.3	Funktionelle Charakterisierung der N318S- und W322C-Kanalvariante in <i>Xenopus</i> Oozyten	74
4.2.4	Einfluss der N318S- und W322C-Kanalvariante auf die Kir2.2- und Kir2.3-Kanäle	76
4.2.5	Oberflächenexpression des N318S- und W322C-Kanals in <i>Xenopus</i> Oozyten	78
4.2.6	Transport der Kir2.1-Kanäle an die Zellmembran	79
4.2.7	Sublokalisierung der W322C-Kanalvariante in Cos-7 Zellen	82
5.	DISKUSSION	85
5.1	IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON MUTATIONEN BEI MARBURGER PATIENTEN	85
5.1.1	Die H1153Y-Mutation im hERG-Kaliumkanal	86
5.1.2	Die G269S-Mutation im KvLQT1-Kaliumkanal	89
5.1.3	Der H558R- und IVS9-3-C>A-Polymorphismus im Nav1.5-Natriumkanal	92
5.2	CHARAKTERISIERUNG EINER NEUEN LQT-FORM	95
ZUSAMMENFASSUNG		100
SUMMARY		102
LITERATURVERZEICHNIS		104
DANKSAGUNG		117
VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER		118
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG		119
ANHANG		120

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AKAP	Proteinkinase-A bindendes Protein
ANK2	Ankyrin B
AP	Aktionspotential
Amp	Ampizillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Andersen-Syndrom
ATP	Adenosin-tri-phosphat
bp	Basenpaare
BS	Brugada-Syndrom
BSA	Rinderserumalbumin
Ca	Kalzium
cAMP	Zyklisches Adenosin-3'5'-Monophosphat
cDNA	Engl. „ <i>complemetary DNA</i> “
CNBD	Engl. „ <i>cyclic nucleotide binding domain</i> “
Cos-7	CVI Origin SV40
cRNA	Engl. „ <i>complementary RNA</i> “
C-Terminus	Carboxyterminus einer Proteinkette
ddH₂O	Doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Engl. „ <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAD	Frühe Nachdepolarisationen
EAG	Engl. „ <i>ether a gogo</i> “
EDTA	Ethyl diamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ER	Endoplasmatisches Retikulum

ERG	Engl. „ <i>ether a gogo related gene</i> ”
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
G3PD1L	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Engl. „ <i>green fluorescent protein</i> ”
HA	Hämagglutinin
HEK	Engl. „ <i>human embryonic kidney</i> ”
hERG	Engl. „ <i>human ether a gogo related gene</i> ”
heteroz.	Heterozygot
homoz.	Homozygot
I	Strom
IPTG	Isopropyl-Beta-D-Thiogalaktopyranosid
IVS	Engl. „ <i>intervening sequence</i> “
JLNS	Jervell & Lange-Nielson-Syndrom
K	Kalium
KChIP	Engl. „ <i>K⁺ channel interacting protein</i> ”
kDa	Kilo Dalton
Kir	Einwärtsgerichteter Kaliumkanal
Kn^r	Kanamycinresistenz
Kv-Kanal	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth</i> -Medium
LD	Kopplungsungleichgewicht (Engl. „ <i>linkage disequilibrium</i> “)
LP	Laufprofil
LQTS	Langes-QT-Syndrom (Engl. „ <i>long QT syndrome</i> ”)
min	Minute
minK	Engl. „ <i>minimal K⁺-channel protein</i> ”
miRP	Engl. „ <i>minK related protein</i> ”
mRNA	Engl. „ <i>messenger RNA</i> ”
ms	Millisekunde
mV	Millivolt
Na	Natrium
Nav1.5	Spannungsgesteuerter Natriumkanal

ND	Nicht definiert
NO	Nitritoxid
NOS	Nitritoxidsynthase
N-Terminus	Aminoterminal einer Proteinkette
OD	Optische Dichte
P	Phosphat
PAS	Per-Arnt-Sim
Pat.	Patient
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDZ	PSD 95-Dlg-ZO-1
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIP₂	Phosphatidylinositol-4,5 Bisphosphat
PKA	Proteinkinase-A
PS	Penicillin/Streptomycin
QT_c	frequenzkorrigierte QT-Zeit
RLU	Relative Lichteinheiten (Engl. „ <i>relative light units</i> “)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (Engl. „ <i>rounds per minute</i> “)
RT	Raum Temperatur, Reverse Transkriptase
RWS	Romano-Ward-Syndrom
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SNP	Engl. „ <i>single nucleotide polymorphism</i> “
SNTA1	α -1-Syntrophin
SQTS	Kurzes-QT-Syndrom (Engl. „ <i>short QT syndrome</i> “)
SSCP	Einzelstrangkonnformationspolymorphismusanalyse (Engl. „ <i>single strand conformation polymorphism</i> “)
SSS	Engl. „ <i>sick sinus syndrome</i> “
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

TCA	Trichloressigsäure
TdP	<i>torsade de pointes</i>
TEA	Tetraethylammonium
TEVC	Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Engl. „ <i>two electrode voltage clamp</i> “)
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TS	Timothy-Syndrom
üN	Über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
VHF	Vorhofflimmern
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Ionenströme des kardialen Aktionspotentials

In Kardiomyozyten existieren unterschiedlichste Ionenkanäle, welche die Form und Dauer des kardialen Aktionspotentials (AP) über ihre spezifische Kinetik bestimmen. In Abbildung 1.1-1 sind das Aktionspotential einer ventrikulären Kardiomyozyte und die wichtigsten daran beteiligten Ionenströme gezeigt.

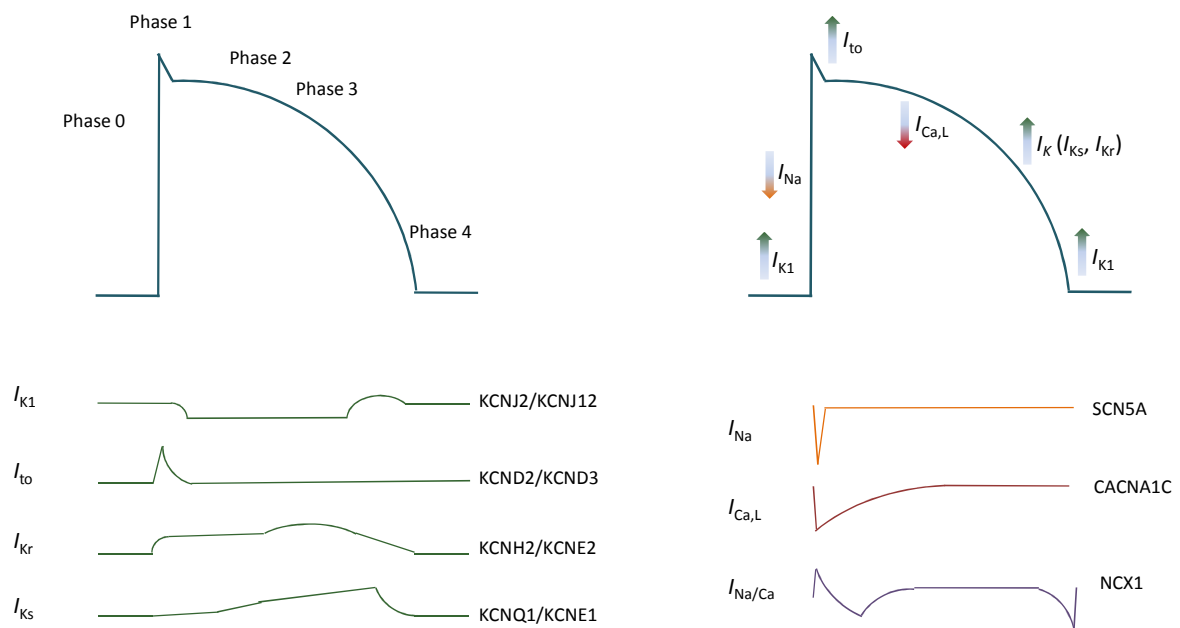


Abbildung 1.1-1: Schematische Darstellung des ventrikulären Aktionspotentials und der wichtigsten zugrunde liegenden Ionenströme.

Die fünf Phasen des kardialen Aktionspotentials sind im oberen Teil der Abbildung gezeigt. Die Phase 0 beschreibt die schnelle Depolarisation, Phase 1 die anteilige Repolarisation, Phase 2 die Plateau-Phase, Phase 3 die schnelle Repolarisation und Phase 4 die Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Rechts sind die repolarisierenden Auswärtsströme und links die depolarisierenden Einwärtsströme dargestellt (modifiziert nach Snyders 1999).

Das Aktionspotential kann in fünf Phasen unterteilt werden. Phase 0 beschreibt die schnelle Depolarisation, Phase 1 die anteilige Repolarisation, Phase 2 die Plateau-Phase, Phase 3 die schnelle Repolarisation und Phase 4 die Aufrechterhaltung des Membranpotentials. In Ruhe besitzt die Kardiomyozyte eine hohe Leitfähigkeit für Kaliumionen, die durch den einwärts gerichtenden I_{K1} -Strom getragen wird, und gleichzeitig eine sehr niedrige Leitfähigkeit für Natriumionen. Während der Depolarisation öffnen die Natriumkanäle und es kommt zu einem schnellen Na^+ -Einstrom I_{Na} (Phase 0). Hat die Depolarisation ihren Maximalwert erreicht, folgt die Phase 1 des kardialen Aktionspotentials. Die anteilige Repolarisation

entsteht durch die Inaktivierung der Natriumkanäle und die Aktivierung des transienten Kalium-Auswärtsstroms I_{to} (Kenyon und Gibbons 1979). Da der I_{to} -Strom im Herzen heterogen exprimiert ist, findet man die typische „notch and dome“-Morphologie nur im Atrium, in den epikardialen Schichten des Ventrikels und in den Purkinje-Fasern (Roden et al. 2002). Die Plateauphase (Phase 2), welche charakteristisch für das kardiale Aktionspotential ist, beruht auf dem Gleichgewicht zwischen dem Einstrom von Kalziumionen (I_{Ca}) und dem Ausstrom von Kalium durch die verzögert öffnenden Kaliumkanäle (I_K) (Weidemann 1951). I_K besteht aus mindestens zwei verschiedenen Strömen I_{Ks} und I_{Kr} , die anhand ihrer pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften unterschieden werden können (Barry und Nerbonne 1996; Sanguinetti und Jurkiewicz 1990). Während der schnellen Repolarisation (Phase 3) sind die Kalziumkanäle fast vollständig inaktiviert, wohingegen die Kaliumströme I_K weiter zunehmen (Noble und Tsien 1969). Aufgrund der Erholung von der Inaktivierung ist der Beitrag des I_{Kr} - und I_{Ks} -Stroms zur Gesamtrepolarisation am Ende des Aktionspotentials am größten (Mitcheson und Sanguinetti 1999). In der terminalen Phase der Repolarisation übernimmt der I_{K1} -Strom wieder eine entscheidende Rolle. Die verzögerten, auswärts gerichteten Kaliumkanäle (I_{Ks} , I_{Kr}) schließen, wenn das Membranpotential wieder erreicht ist, wobei der I_{K1} während der Phase 4 des Aktionspotentials offen bleibt. Maßgeblich für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials (Phase 4) nach der Repolarisation ist der einwärtsrektifizierende I_{K1} -Kaliumstrom (Barry und Nerbonne 1996).

1.2 Das Lange-QT-Syndrom

Arrhythmien sind eine Hauptursache für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität. Vererbte Herzrhythmusstörungen werden meist durch Mutationen in kardialen Ionenkanälen verursacht. In vielen Genen konnten Mutationen nachgewiesen oder mit Arrhythmien assoziiert werden (Tabelle 1.2-1). Jedoch können nach wie vor 30-45 % der auftretenden Arrhythmien nicht mit den bisher bekannten Genen erklärt werden (Splawski et al. 2000; Priori et al. 2003).

Das Lange-QT-Syndrom ist charakterisiert durch eine deutlich längere Aktionspotentialdauer, die im Elektrokardiogramm (EKG) durch ein verlängertes QT-Intervall mit einer QT_c -Zeit von über 440 ms sichtbar wird (siehe Abb. 1.2-1). Frühe Nachdepolarisationen können zu lebensbedrohlichen *torsade de pointes* Tachykardien führen, die in Synkopen resultieren oder in Kammerflimmern übergehen und somit ein Risiko für den plötzlichen Herztod darstellen (Moss et al. 1991; Romano et al. 1963; Schwartz et al. 1975; Ward 1964). Die Verlängerung der Aktionspotentialdauer beruht entweder auf einer verlangsamten Repolarisation infolge einer funktionellen Reduktion der repolarisierenden Kaliumströme oder durch eine Verlängerung der Plateau-Phase durch eine Zunahme der Na^+ - oder Ca^{2+} -Einwärtsströme.

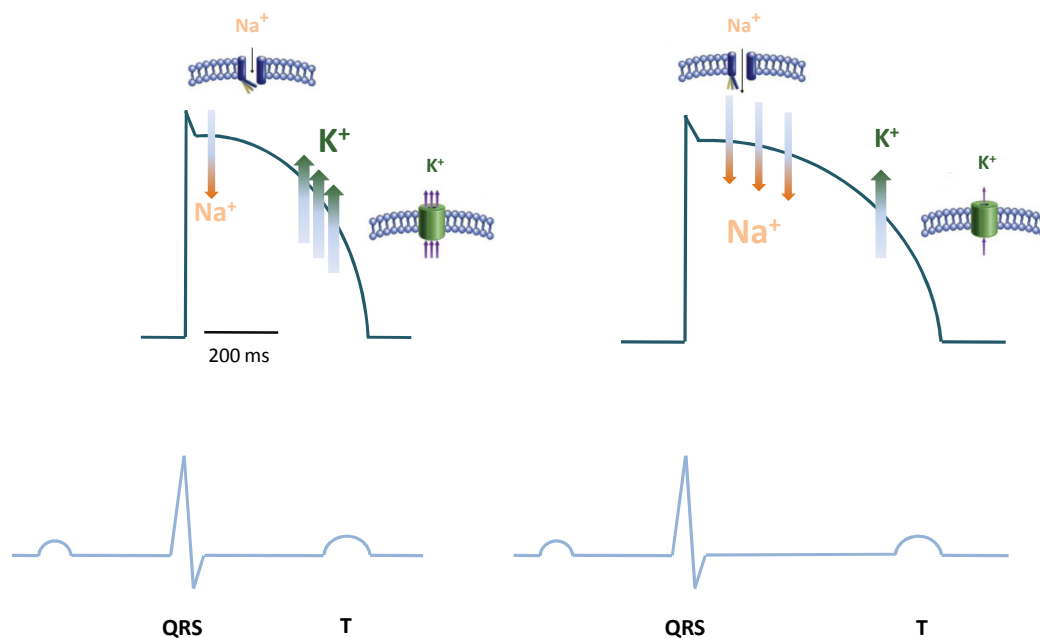


Abbildung 1.2-1: Das Lange-QT-Syndrom.

Im Elektrokardiogramm repräsentiert der QRS-Komplex die ventrikuläre Depolarisation und die T-Welle die terminale ventrikuläre Repolarisation. Das QT-Intervall entspricht der Zeit zwischen der initialen Depolarisation und der finalen Repolarisation des Ventrikels. Ein verminderter Kalium-Auswärtsstrom (grüner Pfeil) oder ein vermehrter Natrium-Einwärtsstrom (orange Pfeile) können zu einer gestörten Repolarisation führen und die Dauer des Aktionspotentials verlängern (rechts). Die längere Repolarisationsdauer ist im EKG durch eine verlängerte QT-Zeit messbar.

Die erste ausführliche Beschreibung des LQT-Syndroms erfolgte im Jahre 1957 von Jervell und Lange-Nielsen (Jervell und Lange-Nielsen 1957). In der von ihnen untersuchten Familie wiesen vier taubstumme Kinder mit Synkopen eine erhebliche Verlängerung des QT-Intervalls auf. Drei Kinder verstarben später an einem plötzlichen Herztod. Romano und Ward beschrieben 1963 und 1964 unabhängig voneinander die gleichen Symptome, nur ohne Hörstörungen (Romano et al. 1963; Ward 1964). Später wurden diese beiden Krankheiten unter dem Namen Langes-QT-Syndrom zusammengefasst.

Bisher sind Mutationen in 12 verschiedenen Genen beschrieben, die zum Langes-QT-Syndrom führen (siehe Tabelle 1.2-1). Die meisten Gene kodieren für Ionenkanäle (KvLQT1, hERG, Nav1.5, Kir2.1) oder für akzessorische Untereinheiten kardialer Ionenkanäle (minK, miRP1). Aber auch Gene wie Ankyrin B, die nicht für Ionenkanäle, sondern für Membran-Adapter-Proteine kodieren, können Ursache des LQTS sein.

Zuerst konnten Mutationen im *KCNQ1*-Gen bei Patienten mit einem Langes-QT-Syndrom nachgewiesen werden (Wang et al. 1996). Die hierbei identifizierten „loss-of-function“-Mutationen resultieren in einem verminderten Kalium-Auswärtsstrom und verlängern die Aktionspotentialdauer. Später wurde gezeigt, dass „gain-of-function“-Mutationen im gleichen Gen auch zum Kurzen-QT-Syndrom führen können (SQT2). Curran *et al.* wiesen *KCNH2*-Mutationen in sechs Familien nach (LQT2) und zeigten über Northern-Blot Analysen, dass der durch dieses Gen kodierte hERG-Kanal im Herzen stark exprimiert ist (Curran et al. 1995). Im gleichen Jahr konnten Wang *et al.* Mutationen im *SCN5A*-Gen, welches den Natriumkanal Nav1.5 kodiert, in Patienten mit LQTS nachweisen (LQT3) und den krankheitsauslösenden Mechanismus aufklären (Wang et al. 1995). Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Mutationen kommt es hier nicht zu einem Funktionsverlust, sondern zu einem vermehrten Natrium-Einwärtsstrom („gain-of-function“). Die Syndrome LQT5 und LQT6 beruhen auf Mutationen in den Kaliumkanal β -Untereinheiten minK (*KCNE1*) (Splawski et al. 1997) und miRP1 (*KCNE2*) (Abbott et al. 1999). Rezessive *KCNE1*-Mutationen können auch zum Jervell-Lange-Nielson-Syndrom (JLNS2) führen. Im Jahr 2003 konnten Möhler *et al.* erstmals in Patienten mit einem Langes-QT-Syndrom Mutationen in einem Gen, dem Ankyrin B, welches nicht für einen Ionenkanal kodiert, nachweisen (LQT4) (Mohler et al. 2003). Ankyrine sind Adapterproteine, welche die integralen Membranproteine mit dem Zytoskelett verbinden. Das LQT7, auch als Andersen-Syndrom bekannt, wird durch Mutationen im *KCNJ2*-Gen hervorgerufen (Tristani-Firouzi et al. 2002; Plaster et al. 2001). Neben der verlängerten QT-Zeit ist das Andersen-Syndrom durch periodische Paralyse und Missbildungen charakterisiert. Beim Timothy-Syndrom (LQT8) kommt es neben

Missbildungen zu einem gehäuftem Auftreten von Autismus. Zuerst zeigten Splawski *et al.*, dass Mutationen im Kalziumkanal Cav1.2 zu diesem Syndrom führen (Splawski *et al.* 2004). Ähnlich wie der Natriumkanal bewirkt der Kalziumkanal einen depolarisierenden Einwärtsstrom. Mutationen im Cav1.2, die dem Timothy-Syndrom zugrunde liegen, bewirken einen Verlust der Inaktivierung des Kanals, dadurch kommt es zu einem intrazellulären Kalzium-Überschuss in verschiedenen Zelltypen. Im Herzen verzögert der Kalziumstrom die Repolarisation der Kardiomyozyten und fördert dadurch Arrhythmien. Vatta *et al.* konnten 2006 Mutationen in einem weiteren Gen, dem Caveolin 3, welches nicht für einen Ionenkanal kodiert, in Patienten mit LQTS nachweisen (Vatta *et al.* 2006). Caveoline sind hoch konservierte integrale Membranproteine, welche an dynamischen und regulatorischen Prozessen der Plasmamembran, wie der Signaltransduktion und dem Vesikel-Transport, beteiligt sind (Westermann *et al.* 2005). Mutationen im Caveolin 3 (LQT9) bewirken einen zwei- bis dreifachen Anstieg der späten Natrium-Einwärtsströme. LQT10 wird durch Mutationen in der Natriumkanal β -Untereinheit *SCN4B* verursacht. Meideros-Domingo *et al.* (2007) konnten damit erstmals Mutationen in einer Natriumkanal β -Untereinheit bei Patienten mit LQT zeigen (Medeiros-Domingo *et al.* 2007). Eine Mutation der β -Untereinheit bewirkt eine Veränderung der Inaktivierung des Natriumkanals. Chen *et al.* (2007) zeigten, dass Mutationen im Proteinkinase-A-bindenden-Protein (AKAP9)-Gen (LQT11) die cAMP-abhängige Phosphorylierung des KvLQT1-Kanals reduzieren und damit die Aktionspotentialdauer verlängern (Chen *et al.* 2007). Bei einem Patienten mit Synkopen und einer QT_c von 530 ms wiesen Ueda *et al.* eine Mutation im α -Syntrophin-Gen (LQT12) nach (Ueda *et al.* 2008). Syntrophine gehören zur Familie der Dystrophin-assoziierten Proteine (Albrecht und Froehner 2002). Ihre wichtigste Aufgabe ist es, verschiedene Proteine (Proteinkinasen, NO-Synthasen und Membranproteine/Ionenkanäle) in unmittelbare Nähe des Muskelproteins Dystrophin zu bringen. NO-Synthasen nitrosylieren den Natriumkanal, verringern die Inaktivierung und erhöhen dadurch die Stromdichte der späten Natrium-Einwärtsströme. Syntrophine weisen eine PDZ-Domäne auf, wodurch sie mit der PDZ-Domäne im C-Terminus des SCN5A interagieren können (Gee *et al.* 1998). Durch die Zerstörung der Interaktion kommt es zu einer geringeren Nitrosylierung des Natriumkanals und zu einer Erhöhung der Stromdichte der späten Natrium-Einwärtsströme.

Tabelle 1.2-1: monogenetische Arrhythmien.

Syndrom	Gen	Genprodukt	Referenz
LQT 1	<i>KCNQ1</i>	K ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Wang et al. 1995)
LQT 2	<i>KCNH2</i>	K ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Curran et al. 1995)
LQT 3	<i>SCN5A</i>	Na ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Wang et al. 1995)
LQT 4	<i>ANK2</i>	Ankyrin B	(Mohler et al. 2003)
LQT 5	<i>KCNE1</i>	K ⁺ -Kanal β -Untereinheit	(Splawski et al. 1997)
LQT 6	<i>KCNE2</i>	K ⁺ -Kanal β -Untereinheit	(Abbott et al. 1999)
LQT 7/AS	<i>KCNJ2</i>	K ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Plaster et al. 2001)
LQT 8/TS	<i>CACAI1C</i>	Ca ²⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Splawski et al. 2004)
LQT 9	<i>CAV3</i>	Caveolin 3	(Vatta et al. 2006)
LQT 10	<i>SCN4B</i>	Na ⁺ -Kanal β -Untereinheit	(Medeiros-Domingo et al. 2007)
LQT 11	<i>AKAP9</i>	Proteinkinase-A-bindenes-Protein	(Chen et al. 2007)
LQT 12	<i>SNTA1</i>	α 1-Syntrophin	(Ueda et al. 2008)
JLNS 1	<i>KCNQ1</i>	K ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Neyroud et al. 1997)
JLNS 2	<i>KCNE1</i>	K ⁺ -Kanal β -Untereinheit	(Tyson et al. 1997)
SQT 1	<i>KCNH2</i>	K ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Brugada et al. 2004)
SQT 2	<i>KCNQ1</i>	K ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Bellocq et al. 2004)
SQT 3	<i>KCNJ2</i>	K ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Priori et al. 2005)
BS 1	<i>SCN5A</i>	Na ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Chen et al. 1998)
BS 2	<i>G3PD1L</i>	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase verwandtes Gen	(London et al. 2007)
BS 3	<i>CACAI1C</i>	Ca ²⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Antzelevitch et al. 2007)
BS 4	<i>CASNB2</i>	Ca ²⁺ -Kanal β 2-Untereinheit	(Antzelevitch et al. 2007)
BS 5	<i>SCN1B</i>	Na ⁺ -Kanal β -Untereinheit	(Watanabe et al. 2008)
BS 6	<i>KCNE3</i>	K ⁺ -Kanal β -Untereinheit	(Delpón et al. 2008)
BS 7	<i>SCN3B</i>	Na ⁺ -Kanal β -Untereinheit	(Hu et al. 2009)
SSS 1	<i>SCN5A</i>	Na ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Benson et al. 2003)
SSS 2	<i>HCN4</i>	Schrittmacherstrom	(Schulze-Bahr et al. 2003)
AF 1	<i>10q22-24</i>	Unbekannt	(Brugada et al. 1997)
AF 2	<i>KCNQ1</i>	K ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Chen et al. 2003)
AF 3	<i>6q14-16</i>	Unbekannt	(Ellinor et al. 2003a)
AF 4	<i>KCNE2</i>	K ⁺ -Kanal β -Untereinheit	(Yang et al. 2004)
AF 5	<i>PITX2</i>	Transkriptionsfaktor	(Gudbjartsson et al. 2009)
AF 6	<i>NPPA</i>	Kardionatriin	(Hodgson-Zingman et al. 2008)
AF 7	<i>KCNA5</i>	K ⁺ -Kanal α -Untereinheit	(Olson et al. 2006)
AF 8	<i>ZFHX3</i>	Transkriptionsfaktor	(Benjamin et al. 2009)

AS, Anderson-Syndrom; TS, Timothy-Syndrom; JLNS, Jervell und Lange-Nielsen-Syndrom; BS, Brugada-Syndrom; SSS, Sick-Sinus-Syndrom; AF, Vorhofflimmern

1.3 Die Rolle des KvLQT1-Kaliumkanals im Herzen (LQT1)

Der KvLQT1-Kaliumkanal ist im Herzen, der Lunge, der Plazenta, im Innenohr und den Nieren exprimiert und an wichtigen physiologischen Funktionen beteiligt (Wang et al. 1996). Zwei Hauptaufgaben des KvLQT1-Kanals sind die Repolarisation des kardialen Aktionspotentials und der Wasser- und Salztransport in den Epithelzellen. KvLQT1 erzeugt zusammen mit der β -Untereinheit minK einen Strom, der dem verzögerten, auswärts gerichteten Kaliumstrom I_{Ks} im Herzen entspricht (Barhanin et al. 1996; Sanguinetti et al. 1996). Die Koexpression von KvLQT1 mit minK resultiert in einer Erhöhung des makroskopischen KvLQT1-Stroms, einer Verlangsamung der Aktivierung und Deaktivierung und einem fast kompletten Verlust der Inaktivierung (Barhanin et al. 1996; Sanguinetti et al. 1996).

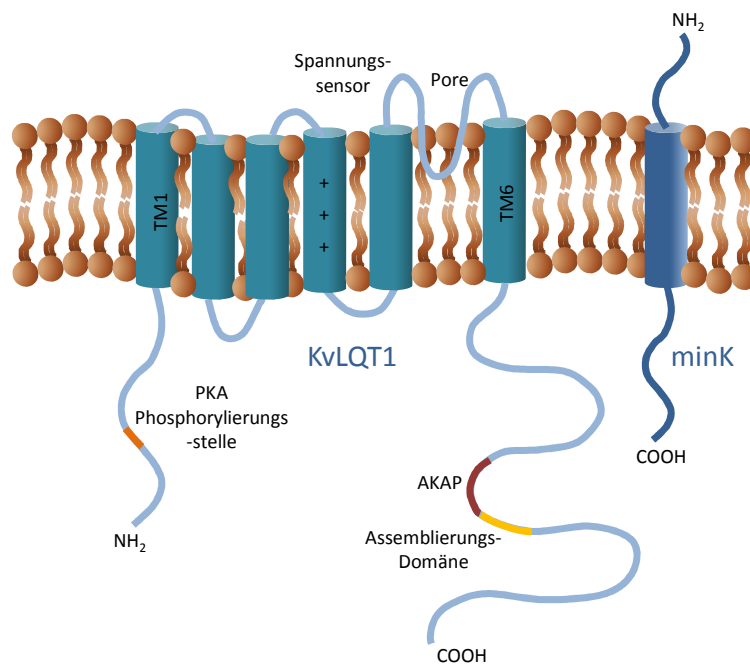


Abbildung 1.3-1: Schematische Darstellung des KvLQT1-Kaliumkanals mit der β -Untereinheit minK.

Der KvLQT1-Kanal ist aus sechs Transmembrandomänen (TM1-6) mit einer Porenschleife zwischen dem S5- und dem S6-Segment aufgebaut. Der Spannungssensor mit den positiven Ladungen befindet sich in der TM4. Der N-Terminus zeigt eine Proteinkinase-A abhängige Phosphorylierungsstelle. Im C-Terminus befinden sich eine Assemblierungsdomäne, sowie eine Domäne, an die sich das Proteinkinase-A-bindende Protein (AKAP) anlagert. Die β -Untereinheit minK besteht aus einer einzelnen Transmembrandomäne. Der N-Terminus liegt extrazellulär.

Die Klonierung des *KCNQ1*-Gens zeigte, dass die längste Isoform-1 676 Aminosäuren groß und auf 16 Exonen kodiert ist (Splawski et al. 1998). Der Kanal ist aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) aufgebaut (vgl. Abb. 1.3-1). Der Spannungssensor befindet sich im vierten Transmembransegment und trägt vier positiv geladene Arginine. Das S5- und das S6-Segment sowie die Porenschleife, mit dem für Kaliumkanäle typischen GYG-Motiv

(Gly-Tyr-Gly), bilden zusammen die kaliumselektive Pore (Barhanin et al. 1996). Die N- und C-Termini liegen intrazellulär, wobei der C-Terminus eine, unter den KvLQT1-Kanälen konservierte, Assemblierungs-Domäne (590-620) aufweist (Schmitt et al. 2000). Der KvLQT1-Kanal besteht aus einem Tetramer von vier Untereinheiten (MacKinnon 1991). Anders als die anderen Mitglieder der *KCNQ*-Familie bildet KvLQT1 keine Heteromere mit anderen KCNQ-Proteinen.

Der I_{Ks} -Strom wird durch Stimulation des sympathischen Nervensystems beispielsweise als Antwort auf emotionalen Stress hochreguliert und führt zu einem schnelleren Herzschlag (Terrenoire et al. 2005). Über eine Aktivierung von β -adrenergen Rezeptoren kommt es zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels, wodurch die Proteinkinase-A stimuliert wird. Die PKA-Regulierung des Kanals erfolgt über einen makromolekularen Signalkomplex. An diesem Komplex ist das Proteinkinase-A-bindende-Protein Yotiao (AKAP9) beteiligt, welches die Proteinkinase-A und die Phosphatase-1 zu der C-terminalen Region des Kanals rekrutiert (Potet et al. 2001). Dieser Komplex schafft eine Mikrodomäne, die die Phosphorylierung des Kanals im N-Terminus an der Position S²⁷ durch die PKA zulässt. Mutationen im AKAP9 (LQT11) reduzieren die cAMP-abhängige Phosphorylierung des KvLQT1-Kanals und konnten in Patienten mit LQTS nachgewiesen werden (Chen et al. 2007). Zudem wird der Kanal über den intrazellulären Regulator Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) reguliert (Loussouarn et al. 2003). PIP₂ stabilisiert die offene Form des Kanals. Zudem verlangsamt PIP₂ die Deaktivierungskinetik und verändert die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung.

Wang *et al.* wiesen nach, dass Mutationen im *KCNQ1*-Gen zum LQT-Syndrom führen (Wang et al. 1996). In 16 Familien mit LQTS konnten sie eine Deletion und 10 missense Mutationen identifizieren. „Loss-of-function“-Mutationen im *KCNQ1*-Gen resultieren in einem verminderten Kalium-Auswärtsstrom und führen zu einer Verzögerung in der Repolarisation und damit zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer (Wang et al. 1996). Mit 40-55 % sind Mutationen in diesem spannungsgesteuerten Kaliumkanal für die häufigste Form des LQTS verantwortlich (Splawski et al. 2000). Heterozygote Mutationen mit einer dominanten Vererbung führen zum LQT1 (Romano et al. 1963; Ward 1964), während homozygote Mutationen mit einem autosomal-rezessiven Erbgang dem Jervell-Lange-Nielsen-Syndrom zugeordnet sind (Jervell und Lange-Nielsen 1957). Bei diesem Syndrom ist der kardiale Phänotyp stärker ausgeprägt. Zudem kommt es, aufgrund einer veränderten Zusammensetzung der Endolymphe im Innenohr durch das Fehlen des I_{Ks} -Stroms, zu Taubheit (Vetter et al. 1996). Mutationen im KvLQT1-Kanal mit einem „gain-of-function“-

Effekt können auch zum Kurzen-QT-Syndrom (Bellocq et al. 2004) und Vorhofflimmern (Chen et al. 2003) führen (siehe Tabelle 1.2-1).

1.4 Die Rolle des hERG-Kaliumkanals im Herzen (LQT2)

hERG-Kanäle (*human ether-à-gogo-related gene*) gehören zur Familie der EAG-Kanäle (*ether-à-gogo*). Diese Kanäle wurden zuerst bei *Drosophila melanogaster*-Mutanten beschrieben, die unter Ethernarkose ein Schütteln der Beine zeigten (Warmke et al. 1991). 1994 wurde durch Homologie-Untersuchungen ein verwandtes Gen (*human ether-à-gogo-related gene*) im menschlichen Genom identifiziert und kloniert (Warmke und Ganetzky 1994). Der hERG-Kanal ist in vielen Geweben, jedoch hauptsächlich im Herz exprimiert (Curran et al. 1995).

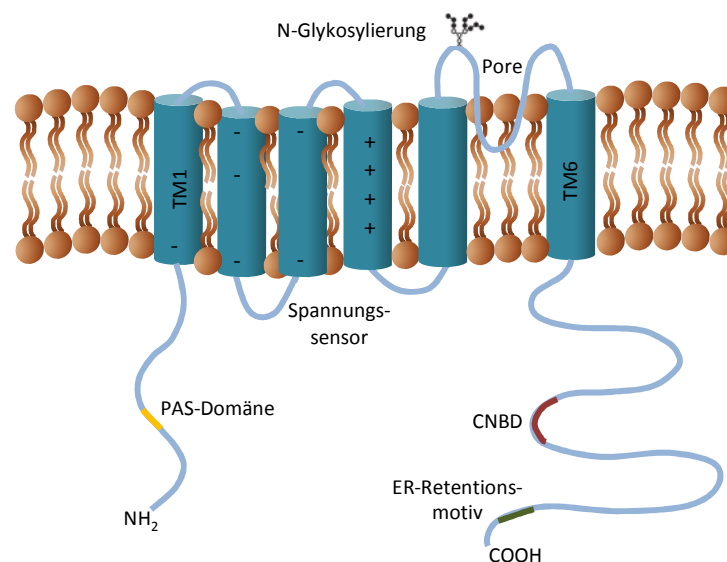


Abbildung 1.4-1: Schematischer Aufbau des hERG-Kaliumkanals.

Der hERG-Kanal ist aus sechs Transmembrandomänen (TM1-6) aufgebaut mit einer Porenschleife zwischen dem S5- und dem S6-Segment. Die ersten vier Transmembransegmente messen die Membranspannung und das S5- und das S6-Segment bilden die kaliumselektive Pore. Die N- und C-Termini liegen intrazellulär. Der N-Terminus weist eine PAS-Domäne und der C-Terminus eine CNB-Domäne auf. Die N-Glykosylierung erfolgt an Position N598.

Die längste Isoform-1 des hERG-Kaliumkanals umfasst 1159 Aminosäuren und ist auf 15 Exonen kodiert (Splawski et al. 1998). Der tetramere hERG-Kanal wird durch die Zusammenlagerung von vier identischen α -Untereinheiten gebildet. Eine Untereinheit ist aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) und einer Porenschleife, zwischen dem S5- und dem S6-Segment, aufgebaut (siehe Abb. 1.4-1). Die Porenschleife trägt ein für Kaliumkanäle typisches GFG-Motiv (Gly-Phe-Gly). Die ersten vier Transmembransegmente messen die Membranspannung, wobei das S4-Segment, wie bei dem KvLQT1-Kanal, im Abstand von

drei Aminosäuren vier positive Ladungen trägt. Das S5- und das S6-Segment bilden die kaliumselektive Pore. Die N- und C-Termini liegen intrazellulär. Der N-Terminus hat eine PAS (Per-Arnt-Sim)-Domäne, die für die Protein-Protein Interaktion entscheidend ist (Morais Cabral et al. 1998), und der C-Terminus eine zyklische-Nukleotid-Bindedomäne (CNBD) (Warmke und Ganetzky 1994). Obwohl früher davon ausgegangen wurde, dass der I_{Kr} -Strom nicht durch cAMP reguliert wird (Curran et al. 1995), ist mittlerweile eine direkte und eine PKA vermittelte cAMP-abhängige Regulation des hERG-Kanals nachgewiesen (Kagan et al. 2002; Thomas et al. 1999).

Sanguinetti *et al.* konnten zeigen, dass hERG der schnellen Komponente des verzögert öffnenden Kaliumkanals I_{Kr} entspricht (Sanguinetti et al. 1995; Trudeau et al. 1995). Der I_{Kr} spielt in der Repolarisation (Phase 3) des kardialen Aktionspotentials eine wichtige Rolle. Bei negativen Membranpotentialen (-80 mV) liegt der hERG-Kanal in einer geschlossenen Konformation vor. Bei der Depolarisation der Membran zu Potentialen positiver als -60 mV öffnet der Kanal, wodurch die Kaliumionen entsprechend des elektrochemischen Gradienten nach außen fließen. Eine weitere Depolarisation der Membran resultiert in einer schnellen C-Typ Inaktivierung des Kanals. Während der Repolarisation kommt es zu einer schnellen Erholung von der Inaktivierung, wodurch der Kanal wieder in den offenen Zustand übergeht. Bei weiterer Repolarisation deaktiviert der Kanal langsam. Die Kinetik des hERG-Kanals unterscheidet sich von anderen Kv-Kanälen in zweierlei Hinsicht. Zum einen ist die Inaktivierung schneller als die Aktivierung, dieses reduziert den Auswärtstrom bei der Depolarisation und verlängert dadurch die Phase 2 des Aktionspotentials. Zweitens ist die Erholung von der Inaktivierung viel schneller als die Deaktivierung. Dadurch wird die Phase 3 des kardialen Aktionspotentials initiiert.

Mutationen im *KCNH2*-Gen führen zum Langen-QT-Syndrom 2 (Sanguinetti et al. 1995; Curran et al. 1995). Bei diesem Syndrom führt ein Funktionsverlust des hERG-Kaliumkanals zu einer gestörten Repolarisation und dadurch zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer, was im Elektrokardiogramm in einer verlängerten QT-Zeit sichtbar ist. 20-40 % der Patienten mit einem LQT-Syndrom weisen Mutationen im *KCNH2*-Gen auf (Splawski et al. 2000). Damit sind Mutationen im hERG-Kanal nach Mutationen im KvLQT1-Kanal die zweithäufigste Ursache für LQTS. Die anderen LQTS-Unterformen machen mit ~8 % nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtheit der LQT-Erkrankungen aus (Schulze-Bahr et al. 1999). Zudem führen Mutationen im hERG-Kanal zu einem Kurzen-QT-Syndrom (Brugada et al. 2004) und zu familiärem Vorhofflimmern (Hong *et al.*, 2005) (siehe Tabelle 1.2-1).

1.5 Die Rolle des Nav1.5-Natriumkanals im Herzen (LQT3)

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle sind für den schnellen Aufstrich des Aktionspotentials in Muskel- und Nervenzellen verantwortlich (Catterall 2000). Im Herzen ist der Natriumstrom wichtig für die Initiation, Ausbreitung und Aufrechterhaltung des normalen Rhythmus. Northern-Blot Analysen haben gezeigt, dass der Nav1.5-Natriumkanal hauptsächlich im Herzen exprimiert ist (Gellens et al., 1992). Das *SCN5A*-Gen ist auf 28 Exonen kodiert und resultiert in einem 2016 Aminosäuren großen Protein (Wang et al., 1996). Der Natriumkanal besteht aus vier homologen Domänen DI-DIV (vgl. Abb. 1.5-1), die über zytoplasmatische Linker verbunden sind (Guy und Seetharamulu 1986). Jede Domäne ist aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut (TM1-TM6). Das vierte Transmembransegment fungiert als Spannungssensor, wobei das S5- und das S6-Segment zusammen mit der extrazellulären Porenschleife die Pore formen (Gellens et al. 1992). Der N- und der C-Terminus des Kanals liegen zytoplasmatisch. Der C-Terminus ist wichtig für Protein-Protein Interaktionen. Er weist ein IQ-Motiv (Tan et al. 2002; Kim et al. 2004), ein PY-Motiv (Abriel et al. 2000) und ein PDZ-Motiv (Gee et al. 1998) auf. Der Natriumkanal umfasst einen Proteinkomplex, der nicht nur die Poren bildende α -Untereinheit, sondern auch verschiedene β -Untereinheiten enthält. Bisher konnten vier verschiedene β -Untereinheiten (*SCN1B-SCN4B*) identifiziert werden (Goldin 2001).

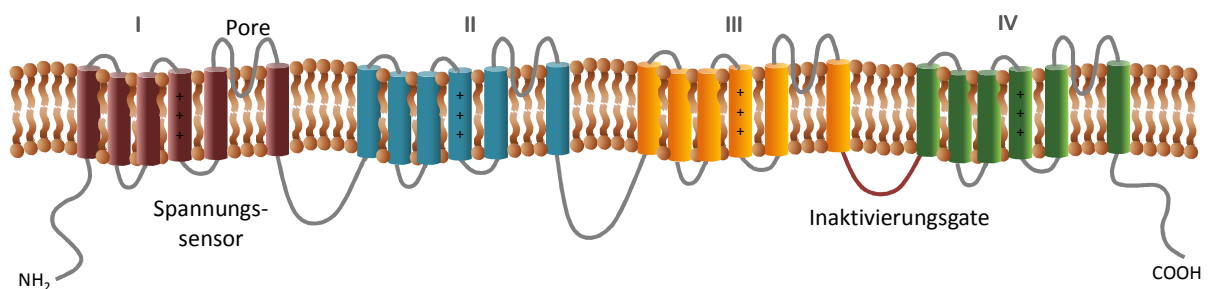


Abbildung 1.5-1: Schematische Darstellung des Nav1.5-Natriumkanals.

Der Natriumkanal ist aus vier homologen Domänen DI-DIV aufgebaut. Die Domänen sind über zytoplasmatische Linker verbunden. Jede Domäne besteht aus sechs Transmembrandomänen (TM1-TM6). Das vierte Transmembransegment fungiert als Spannungssensor, wobei das S5- und das S6-Segment zusammen mit dem extrazellulären Loop (Porenschleife) die Pore formen. Der N- und der C-Terminus des Kanals liegen zytoplasmatisch.

Der Natriumkanal kann drei mögliche Zustände einnehmen: geschlossen, offen, inaktiviert. Während des Ruhemembranpotentials liegt der Kanal in dem geschlossenen Zustand vor. Bei der Depolarisation bewegt sich die positive Ladung im S4-Segment nach außen (Yang und Horn 1995; Stühmer et al. 1989) und der Kanal wird aktiviert (Öffnung der Pore). Fast

gleichzeitig mit der Aktivierung beginnt die Inaktivierung des Kanals. Da die Inaktivierung langsamer ist als die Aktivierung, kommt es zu einem transienten Natrium-Einwärtsstrom während der Phase 0 des kardialen Aktionspotentials. Schnelle und langsame Inaktivierung bewirken ein Schließen des Kanals. Die schnelle Inaktivierung, die in weniger als einigen Millisekunden abgeschlossen ist, ist an die Aktivierung gekoppelt und wird durch die Aufwärtsbewegung des S4-Segments initiiert. Dieses bewirkt, dass die drei hydrophoben Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (IFM-Motiv) und die benachbarten Glycine und Proline im DIII-DIV-Linker die Pore verschließen (Kass 2006; Ulbricht 2005). Während längerer Phasen der Depolarisation gewinnt die langsame Komponente der Inaktivierung an Bedeutung. Hierfür sind wahrscheinlich Konformationsänderungen im S5-S6-Segment, in der Porenschleife und dem DIII-S4-S5-Linker verantwortlich. Bei Eintritt der Repolarisation liegt der Kanal wieder in der geschlossenen Konformation vor. Dieses ermöglicht das Öffnen des Kanals während des nächsten Aktionspotentials. Ein geringer Prozentsatz der Natriumkanäle bleibt geöffnet und generiert den späten Natriumstrom ($I_{Na,L}$, $I_{Na,SUS}$, $I_{Na,p}$). Der späte Natriumstrom macht weniger als 1 % des maximalen Natriumstroms aus.

Wang *et al.* (1995) zeigten, dass „gain-of-function“-Mutationen im *SCN5A*-Gen zum Langes-QT-Syndrom 3 führen (Wang *et al.* 1995). Mit 8-10 % haben Mutationen im Natriumkanal den drittgrößten Anteil an den Ursachen des LQTS (Napolitano *et al.* 2005; Priori *et al.* 2003). Ein Funktionsgewinn des Natriumkanals kann auf unterschiedlichen Mechanismen basieren. Die schnelle Inaktivierung kann verlangsamt, die Erholung von der Inaktivierung beschleunigt, die Stromdichte der späten Natrium-Einwärtströme und die maximale Stromamplitude erhöht sein (Albert *et al.* 2008; Clancy *et al.* 2003; Rivolta *et al.* 2001; Bennett *et al.* 1995; Wang *et al.* 1996; Ruan *et al.* 2007).

„Loss-of-function“-Mutationen hingegen resultieren in verschiedenen Arrhythmien, wie Störungen des Reizleitungssystems (Tan *et al.* 2001), Sick-Sinus-Syndrom (Benson *et al.* 2003), Vorhofflimmern (Ellinor *et al.* 2003; Groenewegen *et al.* 2003), Kammerflimmern und Brugada-Syndrom (Brugada und Brugada 1992) (siehe Tabelle 1.2-1). Zusammengefasst ist ein Verlust der Funktion des Natriumkanals Ursache für viele lebensbedrohliche Herzrhythmusstörungen.

Mutationen im Natriumkanal-Gen resultieren in einem sehr pleiotropen Phänotyp. Ein und dieselbe Mutation kann zu unterschiedlichen kardialen Symptomen in einer Familie führen. Eine Insertion des Aminosäurerestes Aspartat (1795insD) wurde in einer Familie über mehrere Generationen nachgewiesen und zeigte eine große Variabilität im Phänotyp.

Sinusknoten-Dysfunktionen, Bradykardien, Reizleitungsstörungen, Brugada-Syndrom und LQT3 traten einzeln oder in Kombination auf (Bezzina et al. 1999; van den Berg et al. 2001). Auch Patienten, die eine Deletion des Aminosäurerestes Lysin im intrazellulären DIII-DIV Linker (delK1500) tragen, zeigen einen heterogenen klinischen Phänotyp mit Reizleitungsstörungen, LQT- und Brugada-Syndrom (Grant et al. 2002). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es Überschneidungen der verschiedenen Arrhythmien gibt.

Zur funktionellen Charakterisierung von Mutationen im Nav1.5-Natriumkanal existieren drei verschiedene Klone (hH1, hH1a, hH1b), die sich hinsichtlich ihrer Sequenz voneinander unterscheiden. Die Aminosäuresequenz der *SCN5A*-Klone ist zur besseren Übersicht in Tabelle 1.5-1 dargestellt. Die existierenden Klone (hH1, hH1a, hH1b) repräsentieren alle sehr seltene Varianten und keine entspricht der häufigen Celera Sequenz (Makielski et al. 2003).

Tabelle 1.5-1: Vergleich der Aminosäuresequenz der *SCN5A*-Klone hH1, hH1a, hH1b

Aminosäure-Rest	hH1	hH1a	hH1b	Celera
558	H	H	R	H
559	T	A	T	T
618	L	L	I	L
1027	Q	R	R	R
1077	Q	del.	del.	del.

Celera, Celera human genome database

1.6 Die Rolle des Kir2.1-Kaliumkanals im Herzen (Andersen-Syndrom)

In vielen Geweben dient der Kir2.1-Kanal als Stabilisator des Ruhemembranpotentials und als Modulator der zellulären Erregbarkeit. Im Herzen entspricht er dem einwärts gleichrichtenden I_{K1} -Strom (Nakamura et al. 1998).

Es konnten 15 verschiedene Kir-Kanäle identifiziert werden, die in sieben Unterfamilien (Kir1.x-Kir7.x) eingeteilt werden (Doupnik et al. 1995). Die einzelnen Kir-Kanäle unterscheiden sich hinsichtlich der Einwärtsrektifizierung. Kir2.x und Kir3.x zeigen eine starke, Kir4.x eine mittlere, Kir1.1 und Kir6.x eine schwache Einwärtsrektifizierung. Diese Einwärtsrektifizierung entsteht mittels einer spannungsabhängigen Blockierung der Kanalpore durch intrazelluläre Magnesiumionen und Polyamine (Lopatin et al. 1994).

Vier Kir2.1-Untereinheiten bilden einen funktionellen Kanal (Yang et al. 1995). Neben Homomeren kann der Kir2.1-Kanal auch funktionelle Heteromere mit anderen Kanälen der Familie Kir2.x bilden (Preisig-Müller et al. 2002). Dieses weist auf die funktionelle

Komplexität und Diversität hin. Während Kir2.2 und Kir2.3 ebenfalls im Herzen exprimiert sind (Wible et al. 1995; Raab-Graham et al. 1994; Wang et al. 1998), kann der Kir2.4-Kanal nur neuronal nachgewiesen werden (Liu et al. 2001).

Die komplette cDNA des Kir2.1-Kaliumkanals wurde erstmals 1994 von Raab-Graham *et al.* isoliert und kloniert. Northern-Blot Analysen zeigen, dass Kir2.1 im Herzen, Gehirn, in der Plazenta, Lunge und im Skelettmuskel exprimiert ist (Raab-Graham et al. 1994). Das *KCNJ2*-Gen kodiert für einen 427 Aminosäuren großen Kanal mit zwei Transmembrandomänen (TM1-TM2), die über eine extrazelluläre Porenregion (H5) verbunden sind (vgl. Abb. 1.6-1). Die H5-Region beinhaltet den Selektivitätsfilter mit der für Kaliumkanäle typischen GYG-Sequenz (Bichet et al. 2003). Den Kir-Kanälen fehlt die S4-Region, welche unter den Na⁺-, Ca⁺- und K⁺-Kanälen konserviert ist. Die N- und C-Termini liegen im Zytoplasma und bilden die zytoplasmatische Pore des Kanals. Diese Region ist für die Kanalmodulation durch intrazelluläre Regulatoren entscheidend. PIP₂ bewirkt eine Aktivierung (Huang et al. 1998; Zhang et al. 1999; Rohács et al. 1999), Protonen und ATP ein Schließen des Kanals. Die „slide“-Helix bezeichnet den proximalen Abschnitt des N-Terminus, der möglicherweise in Kontakt mit der Plasmamembran steht.

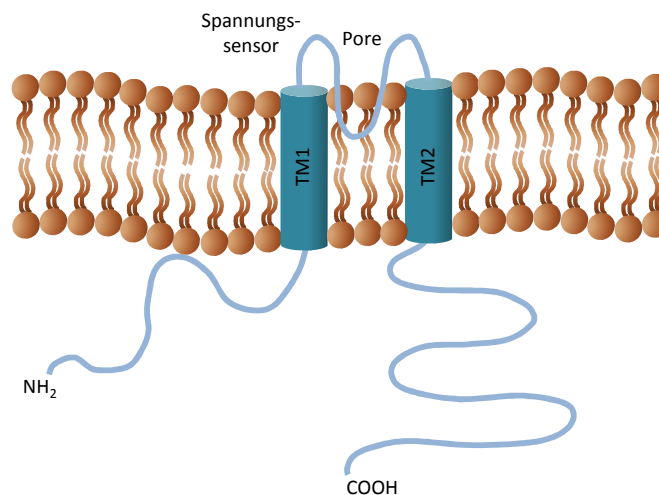


Abbildung 1.6-1: Schematische Darstellung des Kir2.1-Kaliumkanals.

Der Kir2.1-Kanal ist aus zwei Transmembrandomänen und einer Porendomäne aufgebaut, die über eine extrazelluläre Porenregion (H5) verbunden sind. Die H5-Region beinhaltet den Selektivitätsfilter, mit der für Kaliumkanäle typischen GYG-Sequenz. Die N- und C-Termini liegen im Zytoplasma und bilden die zytoplasmatische Pore des Kanals.

Plaster *et al.* wiesen 2001 Mutationen im Kir2.1-Kaliumkanal bei Patienten mit Andersen-Syndrom (LQT7) nach (Plaster et al. 2001).

Das Andersen-Syndrom wurde zuerst 1971 von Andersen beschrieben (Andersen et al. 1971). Dieses seltene Syndrom ist eine Multisystemerkrankung und ist charakterisiert durch einen

Phänotyp der Skelettmuskulatur (periodische Paralyse), einen kardialen Phänotyp (verlängertes QT-Intervall und ventrikuläre Tachykardien) und verschiedene Dysmorphologien. Die Dysmorphologien umfassen eine kurze Statur, Skoliose, Klinodaktylie, Syndaktylie, Brachydaktylie, Hypertelorismus, niedrige oder geneigte Ohren, Kieferanomalien und eine ausgeprägte Stirn (Tawil et al. 1994).

60-70 % der Patienten mit Andersen-Syndrom weisen eine Mutation im Kir2.1-Kanal auf (Tristani-Firouzi et al. 2002). Mutationen bewirken eine Reduktion des I_{K1} -Stroms, wodurch das Aktionspotential in den Myozyten verlängert wird. Durch diese Destabilisierung und Depolarisierung des Ruhemembranpotentials werden ventrikuläre Arrhythmien oder myotone Kontraktionen der Skelettmuskeln gefördert (Tristani-Firouzi et al. 2002; Plaster et al. 2001). Alle bisher beschriebenen Kir2.1-Mutationen bewirken einen absoluten Funktionsverlust und zeigen einen dominant negativen Effekt auf die Wildtyp Kanaluntereinheiten, wodurch der I_{K1} -Strom um mehr als 50 % reduziert wird. Zudem ist es möglich, dass Mutationen im Kir2.1-Kanal unterschiedlich starke dominant negative Effekte auf andere Kanäle der Kir2.x-Familie haben (Preisig-Müller et al. 2002) und dadurch den sehr pleiotropen Phänotyp der Krankheit erklären könnten. Eine verminderte Affinität für PIP_2 kann zu einem Funktionsverlust der Kir2.1-Kanäle führen (Lopes et al. 2002). Auch ein gestörter Transport an die Plasmamembran kann den absoluten Strom reduzieren (Bendahhou et al. 2003). 2007 beschrieben Decher *et al.* einen weiteren krankheitsauslösenden Mechanismus, der durch die Unterbrechung der Interaktion zwischen der „slide“-Helix und der C-terminalen Region des Kir2.1-Kanals hervorgerufen wird (Decher et al. 2007).

Das phänotypische Spektrum der *KCNJ2*-Mutationen wurde 2005 durch Priori *et al.* erweitert (Priori et al. 2005). Der identifizierte D172N-Austausch war die erste Mutation, die zu einem „gain-of-function“-Effekt des Kir2.1-Kanal führte (SQT3). Der Funktionsgewinn des Kanals erhöht den I_{K1} -Strom und verkürzt damit die Aktionspotentialdauer. Neben dem Kurzen-QT-Syndrom können „gain-of-function“-Mutationen auch zum Vorhofflimmern führen (Xia et al. 2005) (siehe Tabelle 1.2-1).

2. Ziele der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war es, bei Patienten mit verschiedenen Arrhythmie-Formen Mutationen und Polymorphismen in bekannten und noch nicht mit Arrhythmien assoziierten Ionenkanalgenen mittels PCR-basierter SSCP-Analyse zu identifizieren und zu charakterisieren. In enger Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, sollten Patienten ausgewählt und genetisch untersucht werden. Zeitgleich war die Etablierung der PCR- und SSCP-Bedingungen an DNA von Kontrollpersonen für die verschiedenen Exone der Ionenkanäle geplant. Dabei war es ein Ziel, die PCR-basierte SSCP-Analyse für die vier klassischen Ionenkanalgene (*KCNH2*, *SCN5A*, *KCNJ2*, *KCNE1*) und sieben ausgewählte neue Kandidatengene (*KCNJ8*, *KCNJ14*, *SCN2B*, *KCND3*, *KChIP2*, *KCNK3*, *SCN1A*) sowie den Promoterbereich des *SCN5A*-Gens zu etablieren. Die Identifizierung der Mutationen sollte über die PCR-basierte SSCP-Analyse und in ausgewählten Fällen über direkte Sequenzierung erfolgen. Identifizierte Mutationen sollten anschließend funktionell mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus* Oozyten charakterisiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die von unserem Kooperationspartner Prof. E. Schulze-Bahr (Universität Münster) identifizierten Mutationen N318S und W322C im Kaliumkanal-Kir2.1 funktionell zu charakterisieren. Beide Mutationen konnten in Patienten identifiziert werden, die ausschließlich einen kardialen Phänotyp und keine für das Andersen-Syndrom typische periodische Paralyse und Dysmorphologien aufwiesen. Bei der Charakterisierung war es eine entscheidende Fragestellung, ob der neuartige klinische Phänotyp mit dem molekularen Phänotyp der Mutationen zu erklären ist. Dabei sollten die elektrophysiologischen Eigenschaften der mutierten Kanäle und der Effekt auf die Kir2.2- und Kir2.3-Kanaluntereinheiten mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme in *Xenopus* Oozyten analysiert werden. Der Transport an die Zellmembran sollte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Versuches in *Xenopus* Oozyten und fluoreszenzmikroskopisch in Cos-7 Zellen untersucht werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Für diese Arbeit wurden folgende Materialien im Reinheitsgrad „pro analysis“ verwendet:

10 % T SSCP-Gele	ETC Elektrophorese-Technik (Kirchentellinsfurt)
100 bp Marker	Peqlab (Erlangen)
50 bp Marker	Peqlab (Erlangen)
6 x Ladepuffer	Peqlab (Erlangen)
Anti-HA Antikörper	Roche (Mannheim)
Anti-rat-Peroxidase Antikörper	Jackson (USA)
Acrylamid	Roth (Karlsruhe)
Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Peqlab (Erlangen)
Albumin	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe)
APS	Roth (Karlsruhe)
Auftragspuffer	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
CD63 Antikörper	Santa Cruz (USA)
Delect-Puffer	ETC Elektrophorese-Technik (Kirchentellinsfurt)
Disc-Puffer	ETC Elektrophorese-Technik (Kirchentellinsfurt)
DMSO	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
DMEM	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	Peqlab (Erlangen)
EEA1 Antikörper	Santa Cruz (USA)
ER-Tracker Blue-White DPX	Molecular Probes
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
FCS	Invitrogen (Karlsruhe)
Formaldehyd 37 %	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
IPTG	Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)

KHCO ₃	Roth (Karlsruhe)
LB-Medium	Roth (Karlsruhe)
Lumineszenz-Substrat	Pierce (Rockford, Illinois)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
Micro Spin cycle pure Kit	Peqlab (Erlangen)
Midi-Kit	QIAgen (Hilden)
Mini-Kit	Peqlab (Erlangen)
mMACHINE®-Kits SP6	Ambion (Austin)
mMACHINE®-Kits T7	Ambion (Austin)
NaCl	Roth (Karlsruhe)
NaEDTA	Roth (Karlsruhe)
Natriumcarbonat	Roth (Karlsruhe)
NH ₄ Cl	Roth (Karlsruhe)
Nukleasefreies Wasser	QIAgen (Hilden)
PBS	Roth (Karlsruhe)
Pfu Turbo Polymerase	Stratagen (Santa Clara)
Proteinase K	Merck (Darmstadt)
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Salpetersäure	Roth (Karlsruhe)
SDS	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Silbernitrat	Roth (Karlsruhe)
SSCP-Puffer	ETC Elektrophorese-Technik (Kirchentellinsfurt)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Tag-Polymerase	Peqlab (Erlangen)
Tris	Roth (Karlsruhe)

3.2 Bakterienstämme

Für Transformationen zwecks DNA-Vermehrung wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen des Stammes DH5 α (Genotyp: F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169*deoRrecA1endA1hsdR17* (rk-,mk+) *phoA**supE44thi1gyrA96relA1* λ -) oder elektrokompetente *E. coli* Zellen DH10B (Genotyp: F-, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*lacZ*, Δ M15, Δ *lacX74*, *recA1*, *endA1*, *ara* Δ 139, Δ (*ara*, *leu*)7697, *galU*, *galK*, λ -, *rpsL*, (StrR) *nupG*) der Firma Invitrogen verwendet.

3.3 Plasmide

Die verwendeten Plasmide für die Expression der Kir2.1-, hERG-, KvLQT1- und Nav1.5-Kanäle in *Xenopus* Oozyten sind in Tabelle 3.3-1 dargestellt. In Tabelle 3.3-2 sind die in pDsRed oder pEGFP klonierten Kir2.1- und hERG-Kanäle für die Expression in Cos-7 Zellen gezeigt. Tabelle 3.3-3 zeigt die verwendeten Minigen-Konstrukte.

Tabelle 3.3-1: Plasmide für die Expression in *Xenopus laevis* Oozyten.

Plasmid	Resistenz	Restriktionsenzym	Polymerase	Referenz
pSGEM-Kir2.1-WT	Ap ^r	<i>NheI</i>	T7	(Tristani-Firouzi et al. 2002)
pSGEM-Kir2.1-W322C	Ap ^r	<i>NheI</i>	T7	diese Arbeit
pSGEM-Kir2.1-N318S	Ap ^r	<i>NheI</i>	T7	diese Arbeit
pKS Kir2.1-WT-HA	Ap ^r	<i>XhoI</i>	T7	(Decher et al. 2007)
pKS Kir2.1-W322C-HA	Ap ^r	<i>XhoI</i>	T7	diese Arbeit
pKS Kir2.1-N318S-HA	Ap ^r	<i>XhoI</i>	T7	diese Arbeit
pSP64-hERG-WT	Ap ^r	<i>EcoRI</i>	SP6	(Sanguinetti et al. 1995)
pSP64-hERG-WT-HA	Ap ^r	<i>EcoRI</i>	SP6	(Huang et al. 2001)
pSP64-hERG-H1153Y	Ap ^r	<i>EcoRI</i>	SP6	diese Arbeit
pSP64 hERG-H1153Y-HA	Ap ^r	<i>EcoRI</i>	SP6	diese Arbeit
pSP64-SCN5A-hH1-WT	Ap ^r	<i>XbaI</i>	SP6	(Gellens et al. 1992)
pSP64-SCN5A-hH1-H558R	Ap ^r	<i>XbaI</i>	SP6	Prof. Dr. Käab
pSP64-KvLQT1-WT	Ap ^r	<i>EcoRI</i>	SP6	(Sanguinetti et al. 1996)
pSP64-KvLQT1-G269S	Ap ^r	<i>EcoRI</i>	SP6	diese Arbeit

Tabelle 3.3-2: Plasmide für die Expression in Säugerzellen.

Plasmid	Resistenz	Referenz
pEGFP-C1-Kir2.1-WT	Kn ^r	diese Arbeit
pDsRed Monomer-C1-Kir2.1-WT	Kn ^r	diese Arbeit
pEGFP-C1-Kir2.1-W322C	Kn ^r	diese Arbeit
pEGFP-C1-Kir2.1-N318S	Kn ^r	diese Arbeit
pEGFP-C3-hERG-WT	Kn ^r	McDonald
pEGFP-C3-hERG-H1153Y	Kn ^r	diese Arbeit

Tabelle 3.3-3: EBD-Minigen-System.

Plasmid	Resistenz	Referenz
EBD-Minigen-System	Ap ^r	(Baralle 2003)
EBD-SCN5A-Exon 10-IVS9-3 C>A	Ap ^r	diese Arbeit
EBD-SCN5A-Exon 10-WT	Ap ^r	diese Arbeit

3.4 Oligonukleotide

Die zur Klonierung und Mutagenese verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 3.4-1 aufgeführt.

Tabelle 3.4-1: zur Mutagenese und Klonierung verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotide	Sequenz	Verwendung
Kir2.1-N318Ssense	ttatctagcaactgaaatcctgtg	Mutagenese Kir2.1 N318S
Kir2.1-N318Santisense	cacaggatttcagttgctagataa	Mutagenese Kir2.1 N318S
Kir2.1-W322Csense	atgaaatcctgtg c ggccaccgct	Mutagenese Kir2.1 W322C
Kir2.1-W322Cantisense	agcgggtggccgcacaggatttcac	Mutagenese Kir2.1 W322C
Kir2.1-XhoIstart	gtccccagctc g agcgatgggcagtgtgcg	Klonierung Kir2.1 in pEGFP-C1
Kir2.1-BamHIende	aggaatc g gacccatattctccgactctc	Klonierung Kir2.1 in pEGFP-C1
KvLQT1-G269Ssense	accctgtacatcagcttctctgggc	Mutagenese KvLQT1 G269S
KvLQT1-G269Santisense	gcccggaagctgatgtacagggt	Mutagenese KvLQT1 G269S
hERG-H1153Ysense	cccctgcacagatacggctcggac	Mutagenese hERG H1153Y
hERG-H1153Yantisense	gtccgagccgtatctgtgcagggg	Mutagenese hERG H1153Y
SCN5A-Exon10-NdeI-forw.	aagtaccacatattgttataggatgctctctgc	Klonierung SCN5A Ex10 in EBD
SCN5A-Exon10-NdeI-rev.	ggtccaacatatgactcagcgataccacattcac	Klonierung SCN5A Ex10 in EBD

Die Oligonukleotide zur Durchführung der Reversen-Transkriptase-Reaktion des Hybrid-Minigen-Systems sind in Tabelle 3.4-2 zusammengefasst. Die für die SSCP-Analyse entworfenen Oligonukleotide sind im Anhang zusammen mit den PCR- und SSCP-Bedingungen dargestellt.

Tabelle 3.4-2: zur Reversen-Transkriptase-Reaktion verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotide	Sequenz	Verwendung
Alfa	caacttcaagctcctaagccactgc	RT-PCR
Bra	taggatccgggtcaccaggaagttggttaaatca	RT-PCR

3.5 Medien und Anzuchtverfahren

Die Zellanzucht des *E. coli* DH5 α oder DH10B Stammes erfolgte über Nacht bei 37 °C in flüssigem LB-Medium [1 % NaCl; 1 % Trypton; 0.5 % Hefeextrakt] oder auf LB-Agarplatten. Antibiotika wurden in Konzentrationen von 100 μ g/ml (Ampicillin) bzw. 50 μ g/ml (Kanamycin) zugesetzt.

3.6 Molekularbiologische und genetische Methoden

3.6.1 Plasmidisolierung aus Bakterien im kleinen Maßstab - Minipräparation

Die Plasmidisolierung erfolgte aus einer 4 ml Übernachtskultur mittels „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ (PeqLab) nach Angaben des Herstellers.

3.6.2 Plasmidisolierung aus Bakterien im großen Maßstab - Midipräparation

Die Plasmidisolierung wurde aus einer 50 ml Übernachtskultur mittels „Plasmid Midi Kit“ (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.6.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Dafür wurden Gele mit 1-2 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer [40 mM Tris; 40 mM Essigsäure; 1 mM EDTA] verwendet, die mit 0,1 ng/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Vor der

Auftrennung im elektrischen Feld wurde zu den Proben 6 x DNA-Probenpuffer [50 % Glycerin; 0,1 % EDTA; 1 % SDS; 0,1 % Bromphenolblau] gegeben. Zur Bestimmung der DNA-Fragmentgröße diente der DNA-Längenstandardmarker, Lambda DNA/Eco47I (AvaII) der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder der 50 sowie 100 bp Marker der Firma Peqlab (Erlangen). Der Gellauf wurde in einer Agarosegel-Laufkammer bei 100-110 V für 20-60 min durchgeführt. Die Detektion der aufgetrennten DNA erfolgte mit einem UV-Transilluminator bei 304 nm und die Dokumentation mit einer Gel-Dokumentationsanlage.

3.6.4 Restriktionsverdau

Die Restriktion wurde mit Restriktionsenzymen der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für drei Stunden oder über Nacht bei enzymabhängiger Temperatur.

3.6.5 Ligation

Alle Ligationen erfolgten mit der T4-DNA-Ligase der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und dem dazugehörigen T4-DNA-Ligase-Puffer. Das Verhältnis von Vektor- zu Fragment-DNA betrug 1:5. Die Ligationen erfolgten über Nacht bei 18 °C.

3.6.6 Transformation

Zu 50-100 µl chemisch DH5α Zellen wurde der gesamte Ligationsansatz oder 0,5-1 µl Plasmid-DNA hinzugegeben und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Bei einer Plasmid-Transformation wurden die Zellen für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend direkt 100 µl auf LB-Agaroseplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen. Im Falle einer Ligation oder Mutagenese erfolgte ein Hitzeschock für 60 Sekunden bei 42 °C. Im Anschluss wurde zu jedem Transformationsansatz 900 µl LB-Medium gegeben und die Zellen bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Zur Ankonzentrierung wurde der Ansatz zunächst für 4 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Restüberstand resuspendiert und dann auf LB-Agaroseplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.6.7 Elektroporation

Zu 100 µl elektrokompetenten *E.coli*-Zellen ElectroMAX DH10B der Firma Invitrogen wurde der gesamte Ligationsansatz hinzugegeben. Die Zellen wurden in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand: 2 mm) pipettiert und ein elektrischer Impuls von 4,5-5,0 ms appliziert (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Unmittelbar im Anschluss wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium (RT) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C geschüttelt inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Ansatz für 4 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Restüberstand resuspendiert und auf LB-Agaroseplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.6.8 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al. 1986) ermöglicht die Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente in einer exponentiell verlaufenden Polymerisierungsreaktion. Die Reaktionen der PCR erfolgen zyklisch, wobei die Einzelreaktionen der PCR temperaturabhängig sind und in drei Schritten verlaufen. Zuerst erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA, wobei diese in Einzelstränge getrennt wird. Als zweiter Schritt schließt sich das Annealing an. Hierbei erfolgt die Anlagerung der Primer an die komplementären Abschnitte der DNA. Die anschließende Elongation bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, schließt den Zyklus ab. Standardmäßig wurde die Taq-Polymerase der Firma Peqlab verwendet. Im Falle von Klonierungen wurde die Pfu-Turbo-Polymerase (Stratagen) genutzt, da sie eine *Proof Reading*-Aktivität besitzt. Die Primer für die SSCP-Analyse wurden so entworfen, dass PCR-Produkte von 200-300 bp entstehen. Einige sehr kleine Kandidatengene wurden auch direkt sequenziert. Dann wurden Fragmente bis 800 bp amplifiziert. Es wurde viel Zeit in die Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen für die SSCP-Analyse investiert. Bei dieser Methode ist es besonders wichtig, dass möglichst wenige Nebenprodukte entstehen und das PCR-Amplifikat effizient amplifiziert wird.

Die etablierten PCR-Bedingungen und die verwendeten PCR-Laufprofile der einzelnen Gene sind im Anhang zusammenfassend dargestellt. Meist setzte sich der 50 µl Reaktionsansatz aus 2 µl DNA (5 ng/µl), 2 µl sense Primer (10 µM), 2 µl antisense Primer (10 µM), 5 µl 10 x Puffer (Peqlab), 1 µl dNTP (10 mM, Peqlab), 35,7 µl nukleasefreiem Wasser (Quiagen) und 2,3 µl Tag-Polymerase (Peqlab) zusammen. Zu einigen Reaktionen wurde auch 5-10 %

DMSO gegeben oder die Primermenge erhöht. Neben der Standard-PCR wurde auch eine Touchdown-PCR oder eine Nested-PCR durchgeführt. Diese sind nachfolgend beschrieben.

3.6.9 Touchdown-PCR

Die Touchdown-PCR stellt gegenüber der Standard-PCR nur eine Abwandlung des Thermocycler-Profiles dar. Dabei wird sich der Annealing-Temperatur der Primer von einer höheren Temperatur ausgehend angenähert. Durch die höheren Temperaturen binden die Primer sehr spezifisch und es entstehen nur sehr wenige Nebenprodukte durch Fehlanlagerungen. Die Amplikate werden dann bei der eigentlichen Annealing-Temperatur der Primer vervielfältigt. Die verwendeten PCR-Laufprofile sind ebenfalls im Anhang zusammengefasst.

3.6.10 Nested-PCR

Mit Hilfe der Nested-PCR können sehr geringe DNA-Mengen amplifiziert werden. Dabei erfolgen nacheinander zwei getrennte PCR-Reaktionen. Das Produkt der ersten PCR wurde als Template bei der zweiten PCR eingesetzt und die Primer so ausgewählt, dass sie innerhalb des ersten Amplifikat binden. Für die zweite PCR wurden 2 µl aus der ersten PCR verwendet. Die PCR-Laufprofile weichen nicht von den Standard PCR-Laufprofilen ab.

3.6.11 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des „Peq Gold Micro Spin Cycle Pure Kits“ der Firma Peqlab (Erlangen) nach Angaben des Herstellers. Ein 50 µl PCR-Ansatz wurde dabei in 12 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und 2 µl zur Sequenzierung eingesetzt.

3.6.12 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalysen wurden durch die Firma Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Im Falle von Plasmiden wurden mindestens 300-400 ng DNA eingeschickt. Bei PCR-Produkten von 200-300 bp waren 50 ng ausreichend.

3.6.13 Einführung von Punktmutationen mittels ortsgerichteter Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) nach Herstellerangaben verwendet. Nach der PCR wurde die Template DNA für 1 h bei 37 °C mit *DpnI* verdaut und das PCR-Produkt in *E.coli* DH5 α Zellen transformiert.

3.6.14 Hybrid-Minigen-System

Die Auswirkung von Mutationen und Polymorphismen auf das Spleißing wurde mittels des α -Globin-Fibronectin EBD-Minigen-Systems von Baralle (Baralle 2003) untersucht. Das ursprüngliche α -Globin-Fibronectin-EBD-Minigen-System (Muro et al. 1999; Caputi et al. 1994) wurde durch die Entfernung des EBD-Exon modifiziert, um eine Stelle für die Insertion von Exonen zu generieren (Pagani et al. 2000). Das Minigen enthält 3 kb intronische und exonische Fragmente des humanen Fibronectin-Gens, die in das Exon 3 des humane α -Globin-Gens inseriert wurden (vgl. Abb. 3.6.14-1). In dieses System können verschiedene Exone mit flankierenden intronischen Sequenzen über *NdeI*-Schnittstellen eingebracht werden, um das Spleißing von Sequenzvarianten zu untersuchen.

Das zu untersuchende Exon mit dem Nukleotidaustausch und ungefähr 200 bp flankierenden intronischen Sequenzen wurde aus der entsprechenden Patienten-DNA und einer gesunden Kontroll-DNA amplifiziert. Die Primer enthielten jeweils eine *NdeI*-Schnittstelle. Das PCR-Produkt wurde zunächst in einen mit *SmaI* linearisierten Puc18-Vektor kloniert. Danach wurde das Exon über die *NdeI*-Schnittstellen in das Minigen-Konstrukt eingebracht.

Anschließend wurden 0,5 μ g des EBD-Minigen-Konstrukts in HEK-293 Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem Zellspatel in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und in 200 μ l PBS resuspendiert. Die RNA-Extraktion erfolgte nach 48 h mittels des „High pure RNA Isolation Kit“ der Firma Roche nach Angaben des Herstellers.

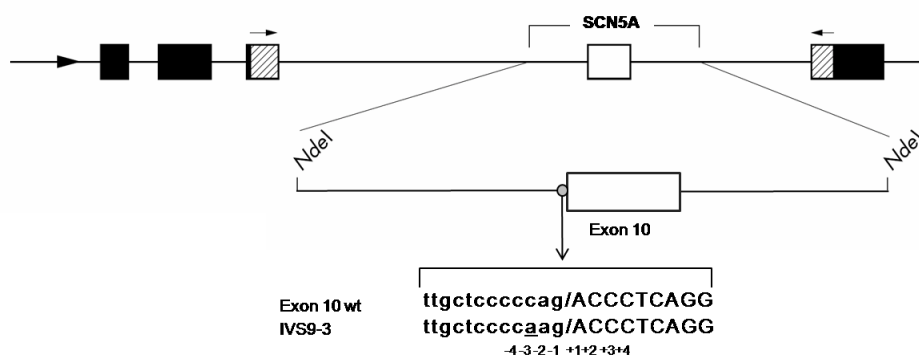


Abbildung 3.6.14-1: Schematische Darstellung des modifizierten α -Globin-Fibronectin-EBD-Minigen-Systems.

Das Minigen enthält 3 kb intonische und exonische Fragmente (Boxen) des humanen Fibronectin-Gens, die in das Exon 3 des humanen α -Globin-Gens inseriert wurden. In dieses System können verschiedene Exone mit flankierenden intronischen Sequenzen über *NdeI*-Schnittstellen eingebracht werden, um das Spleißing von Sequenzvarianten zu untersuchen. Die Pfeile entsprechen den Primern, die für die Reverse-Transkriptase-PCR verwendet wurden.

Mit der isolierten RNA wurde gleich im Anschluss eine Reverse-Transkriptase-Reaktion durchgeführt. Dazu wurde 1 μ l Oligo(dt) 500 μ g/ml, 1 μ l RNA (\sim 1 μ g/ μ l), 1 μ l dNTP (10 mM) mit 9 μ l nukleasefreiem Wasser gemischt, für 5 min bei 65 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gekühlt. Dann wurden 4 μ l 5 x First-Strand Puffer und 2 μ l 0,1 M DTT hinzu pipettiert und alles für 2 min bei 42 °C inkubiert. Zum Schluss wurden 1 μ l Superscript II Reverse Transkriptase (200 U, Invitrogen) hinzugegeben und die Reaktion für 50 min bei 42 °C durchgeführt. Zur Inaktivierung der Reaktion erfolgte eine Erhöhung der Temperatur auf 70 °C für 15 min.

Mit der gewonnenen cDNA wurde eine PCR durchgeführt. Hierzu wurden 2 μ l cDNA, 5 μ l 10 x Puffer, 2 μ l Primer Alfa (10 μ M), 2 μ l Primer BraI (10 μ M), 1 μ l dNTP (10 mM), 1 μ l MgCl₂ (25 mM), 0,4 μ l Ampli TaqGold (Roche) und 36,6 μ l nukleasefreiem Wasser gemischt. Das PCR-Laufprofil umfasste eine einmalige 3 min Doppelstrang-Denaturierung bei 94 °C und dann 35 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 95 °C, 30 sec Primer-Annealing bei 52 °C und 30 sec Primer-Extension bei 72 °C. Eine finale Elongation erfolgte für 5 min bei 72 °C, am Ende wurde die Temperatur bei 15 °C gehalten. Die Produkte wurden mittels Gelelektrophorese und Sequenzierung überprüft.

3.6.15 *In vitro* Transkription

Zur Injektion von *Xenopus laevis* Oozyten wurde plasmidkodierte cDNA in komplementäre cRNA umgeschrieben. Dazu musste zunächst die Plasmid-DNA linearisiert werden. Die

Wahl des Restriktionsenzym richtete sich dabei nach dem Expressionsvektor. Es wurden 4 µg DNA mit Restriktionsenzymen der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) nach Angaben des Herstellers für drei Stunden bei enzymabhängiger Temperatur linearisiert. Die Vollständigkeit der Linearisierung wurde mittels Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde die linearisierte DNA mit Hilfe des „Peq Gold Micro Spin Cycle Pure Kits“ der Firma Peqlab nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Zur Synthese von cRNA wurden die SP6 oder T7 Kits der Firma Ambion verwendet. Je nach Vektor und Promoter wurde entweder die T7 oder Sp6 Polymerase verwendet. Für einen Reaktionsansatz von 15 µl wurden folgende Volumina eingesetzt: 4,5 µl linearisierte Plasmid-DNA, 7,5 µl 2x NTP/CAP (Sp6 oder T7), 1,5 µl 10x Reaktions-Puffer und 1,5 µl Enzym-Mix. Der Transkriptionsansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Um anschließend die DNA aus dem Ansatz zu entfernen, folgte ein Verdau mit 1 µl *DNAseI* (2 U/µl) für 15 min bei 37 °C. Die Qualität der cRNA wurde mittels Gelelektrophorese auf einem 1,5 %-igen Agarosegel überprüft.

3.6.16 Lithium-Chlorid-Präzipitation der cRNA

Zur quantitativen Bestimmung der cRNA musste der cRNA-Syntheseansatz zunächst mit Hilfe einer Lithium-Chlorid-Präzipitation von Komponenten befreit werden, die die Messung stören könnten (z.B. Proteine und nicht eingebaute Nukleotide). Dazu wurde, im Anschluss an den *DNAse*-Verdau, der Ansatz mit 25 µl Li-Cl-Präzipitationslösung (7,5 M Lithium-Chlorid, 50 mM EDTA) und 30 µl RNase freiem Wasser gemischt und für 30 min bei - 20°C inkubiert. Ein Zentrifugationsschritt (30 min, 13000 rpm, 4 °C) diente zur Pelletierung der cRNA. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 %-igem Ethanol aufgenommen. Durch Zentrifugation für 20 min bei maximaler Geschwindigkeit wurde die cRNA erneut pelletiert und anschließend das Ethanol vollständig entfernt. Auf diesen Waschschrift folgte die Trocknung des Pellets für circa 5 min bei 37 °C. Das Pellet wurde in 15-20 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert und die Qualität erneut auf einem 1,5 %-igen Agarosegel überprüft.

3.6.17 RNA-Quantifizierung

Die Konzentration der cRNA wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers („Genequant“, Pharmacia Biotech) bestimmt. Dazu wurde die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von

260 nm gemessen. Eine OD von 1 entspricht bei dieser Wellenlänge einer RNA-Konzentration von 40 ng/μl.

3.6.18 Quantifizierung der Oberflächenexpression von Proteinen

Zur Quantifizierung der Oberflächenexpression von extrazellulär mit einem Hämagglutinin (HA)-Epitop markierten Ionenkanälen wurden für jedes zu untersuchende Konstrukt mindestens 30 Oozyten mit entsprechender cRNA injiziert. Als Negativkontrolle dienten Oozyten, die mit Wasser injiziert wurden. Die Expression der Kanäle erfolgte für zwei Tage bei 18 °C.

Die Oozyten wurden zunächst in 400 μl ND96-Lösung mit 1 % BSA für eine halbe Stunde bei 4 °C blockiert. Währenddessen wurde das Lumineszenz-Substrat (Pierce) nach Herstellerangaben angesetzt (20 μl pro Oozyte, 1:1 Reagenz A: Reagenz B) und im Dunkeln aufbewahrt. Anschließend erfolgte eine 60 min Inkubation der Oozyten in ND96-Lösung mit 1 % BSA und dem 1. anti-HA-Antikörper (Roche, Verdünnung 1:100) bei 4 °C. Danach wurden die Oozyten 6 x mit ND96-Lösung mit 1 % BSA für insgesamt 30 min bei 4 °C gewaschen und für 60 min in die Lösung mit dem Zweitantikörper (anti rat-POD, Jackson) überführt (Verdünnung 1:500 in ND 96 mit 1 % BSA; 4 °C). Anschließend erfolgte eine erneute Waschung der Oozyten über 60 min in ND96-Lösung mit 1 % BSA und 15 min in ND96-Lösung. Um die relativen Lichteinheiten (RLU/s) zu bestimmen, wurde jede Oozyte einzeln in 20 μl Lumineszenz-Substrat transferiert und in einem Luminometer des Typs LB9507 EG&G Berthold Lumat gemessen.

3.6.19 Einzelstrangkonnformationsanalyse

Zur Identifizierung von Mutationen und Polymorphismen in klassischen LQT-Genen und neuen Kandidatengenen der Marburger Arrhythmie-Patienten wurde die PCR-basierte Einzelstrangkonnformations (SSCP)-Analyse angewandt. Diese Methode wurde erstmals 1989 von Oriata *et al.* beschrieben und basiert auf den verschiedenen Sekundärstrukturen, die einzelsträngige DNA-Moleküle eines denaturierten DNA-Fragments aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen annehmen können (Orita et al. 1989). Tritt eine Mutation oder ein Polymorphismus auf, nimmt der Einzelstrang aufgrund seiner abweichenden Primärsequenz eine andere Sekundärstruktur ein und zeigt folglich ein anderes

Laufverhalten im nativen SSCP-Gel, das in einem anderen Bandenmuster resultiert (vgl. Abb. 3.6.19-1).

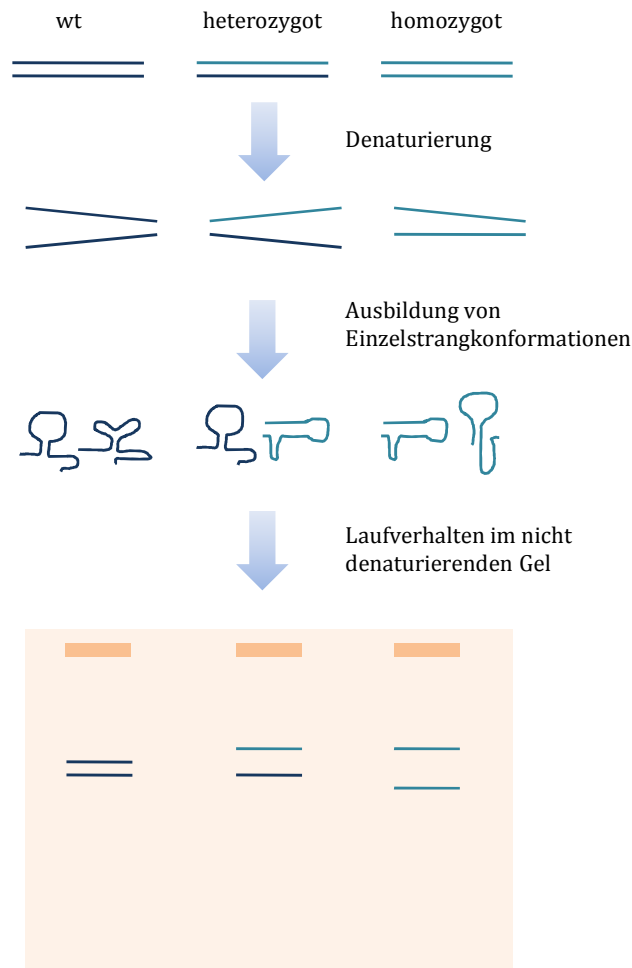


Abbildung 3.6.19-1: Schematische Darstellung des Prinzips der SSCP-Analyse.

Die WT DNA ist in dunkelblau und die mutierte DNA in hellblau dargestellt. Die PCR-Produkte sind im oberen Teil gezeigt. Verschiedene Einzelstrangkongformationen führen zu einem unterschiedlichen Laufverhalten im nativen Gel. Liegt eine Mutation heterozygot vor, kommt es zu einem Bandenshift einer Bande. Eine homozygote Mutation führt zu einem Bandenshift in beiden Banden (verändert nach Grompe 1993).

Bei PCR-Produkten von bis zu 200 bp Größe können mittels SSCP-Analyse 70-95 % der Mutationen detektiert werden. Die Sensitivität der Methode sinkt mit steigender Fragmentgröße (Grompe 1993). Folglich wurden die Primer zur Amplifizierung der Exone und der Exon/Intron-Grenzen so entworfen, dass das amplifizierte PCR-Produkt 300 bp nicht überschreitet. Jedes Primer-Paar wurde zunächst an der DNA von Kontrollpersonen getestet. Dabei wurden die PCR-Bedingungen so variiert, dass nur eine PCR-Bande und keine Nebenprodukte entstehen. Unter diesen etablierten Bedingungen wurden die Patienten-DNA amplifiziert und das PCR-Produkt auf einem 1,5 % Agarosegel überprüft.

Für die SSCP-Analyse wurden SSCP-Gele mit einer Gesamt-Acrylamidkonzentration von 10 % T (Clean Gel, 52 S) der Firma ETC Elektrophorese-Technik verwendet. Bevor die PCR-Proben aufgetragen werden konnten, erfolgte eine Rehydrierung der Gele für zweimal 40 min in einem von drei verschiedenen Puffern (SSCP-, Disc- und Delect-Puffer). Aufgrund des unterschiedlichen pH-Wertes resultieren die verschiedenen Puffer in unterschiedlich scharfen Banden. Die Auswahl des richtigen Puffers für jedes PCR-Fragment ist entscheidend. Anschließend wurde das SSCP-Gel mit Filterpapier getrocknet und auf die vorgekühlte SSCP-Platte mit Hilfe von 70 %-igem Ethanol luftblasenfrei aufgelegt. Das Ethanol wurde anschließend wieder mit Filterpapier abgesaugt, bis sich das Gel nicht mehr verschieben ließ. Die mit Elektrodenpuffer durchtränkten Elektrodenstreifen wurden an den Rand des Gels aufgelegt. Die PCR-Produkte wurden 1:1 mit Formamid gemischt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und danach sofort auf Eiswasser gekühlt. Hierbei kommt es nicht nur zur langsamen Renaturierung, sondern auch zu Rückfaltungen und zur Bildung von Sekundärstrukturen. Es wurden 4 µl der Probe auf das SSCP-Gel aufgetragen und diese bei 200 V und konstant 15 °C für 20 min in die Bunnens einlaufen gelassen. Danach erfolgte der Lauf für 60-100 min bei 600 V. Die Banden wurden mittels Silberfärbung detektiert.

3.7 Biochemische Methoden und analytische Methoden

3.7.1 DNA-Isolation aus EDTA-Blut

Die DNA-Isolation aus EDTA-Blut wurde nach der Methode von Baas *et al.* und Miller *et al.* durchgeführt (Baas *et al.* 1984; Miller *et al.* 1988). Es wurden 10 ml EDTA-Vollblut in 30 ml kaltem Lysispuffer [155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0,1 mM NaEDTA; pH 7,4] aufgenommen und in ein 50 ml Falcon überführt. Die Hämolyse geschah bei mehrmaligem Schwenken für 30 min auf Eis. Anschließend folgte eine Zentrifugation der Leukozyten für 15 min bei 5000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 10 ml kaltem Lysispuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (500 rpm, 15 min, 4 °C). Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis der Überstand klar war. Zur Proteolyse wurden zum Pellet 5 ml SE-Puffer [75 mM NaCl; 25 mM NaEDTA; pH 8], 50-100 µl Proteinkinase K (10 mg/ml) und 250 µl 20 % SDS hinzugegeben und der Ansatz bei 55 °C über Nacht inkubiert. Zur abgekühlten Lösung wurden 1,5 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzugefügt. Diese Suspension wurde 15 s gevortext und anschließend 15 min bei 25 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt und die DNA mit 12 ml absolutem

Ethanol, unter vorsichtigem Schwenken, aus dem Überstand ausgefällt. Dieses DNA-Präzipitat wurde mit Ethanol gespült und mit Hilfe einer Pipette in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in 1 ml nukleasefreiem Wasser gelöst (ün, 37 °C).

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch bei 260 nm. Zusätzlich wurde der Proteinanteil bei 280 nm bestimmt. Das Verhältnis der Extinktionen bei 260 und 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) gibt Auskunft über die Reinheit der Nukleinsäuren und sollte 2,0 +/- 0,2 betragen.

3.7.2 Silberfärbung

Die Detektion der DNA-Einzelstränge im SSCP-Gel erfolgte mit einer modifizierten Silberfärbung nach Bassam *et al.* (Bassam et al. 1991). Zunächst wurde das Gel für 5 min in 10 %-igem Ethanol fixiert. Bei Verwendung des Delect-Puffers wurde das SSCP-Gel, aufgrund des sehr niedrigen pH-Wertes, für zweimal je 15 min in 10 %-igem Ethanol inkubiert. Anschließend erfolgte die Oxidation der Nukleinsäuren für 2 min in 1 % Salpetersäure. Auch dieser Schritt wurde bei Verwendung des Delect-Puffers auf zweimal 10 min erhöht. Die Färbung mit 0,2 % Silbernitratlösung erfolgte für 30 min, wobei sich die Silberionen an die DNA-Moleküle anlagern. Danach wurde das Gel dreimal kurz mit bidestiliertem Wasser gespült, um überschüssiges Silber auszuwaschen. Bei der Färbung des SSCP-Gels in 3 % Natriumcarbonatlösung mit 1,85 % Formaldehyd wurden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Die Fixierung erfolgte für mindestens 10 min in 10 % Essigsäure. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt und anschließend über Nacht getrocknet.

3.8 Elektrophysiologie

3.8.1 Injektion von cRNA in *Xenopus laevis* Oozyten

Die Injektion der *Xenopus laevis* Oozyten erfolgte mit Hilfe von Glaskapillaren „3,5“ Drummond Replacement Tubes“ (Drummond Scientific Company). Die zur Injektion benötigte Form wurde mittels eines Pipettenziehers „DMZ-Universal Puller“ (Zeitz) und durch manuelle Nachbehandlung an einer „Microforge“ (Narishige) erreicht. Injektionen erfolgten anhand eines „Nanoject II“ Mikroinjektors (Drummond Scientific Company). In *vitro* synthetisierte cRNA wurde in das Zytoplasma der *Xenopus laevis* Oozyten injiziert. Bis

zum Zeitpunkt der Messung wurden die Oozyten bei 18 °C in einer modifizierten extrazellulären Messlösung ND96 [NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, Theophyllin 0,5 mM, Natrium-Pyruvat 2,5 mM, Gentamycin 50 µg/µl, pH 7,5] aufbewahrt.

3.8.2 Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus laevis* Oozyten

Die Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* sind undifferenzierte, omnipotente Einzelzellen. Sie eignen sich gut als heterologes Expressionssystem für die Untersuchung von Mutationen in Ionenkanälen.

Mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme kann der Stromfluss durch die Kanäle in der Oozytenmembran in Abhängigkeit vom Membranpotential gemessen werden. Diese Technik geht auf Arbeiten von Cole und Curtis (Cole 1979) zurück und wurde in der vorliegenden Arbeit modifiziert nach Stühmer (Stühmer 1992) durchgeführt. Zwei Messelektroden aus Glas werden in die Oozyte eingestochen. Die Spannungselektrode misst die aktuelle Potentialdifferenz zwischen dem Inneren der Oozyte und der Badlösung. Über die Stromelektrode kann Ladung in die Oozyte injiziert werden.

Alle elektrophysiologischen Messungen an Oozyten wurden entweder mit einem „Axoclamp 900A“ Verstärker (Axon Instruments) in Kombination mit dem Analog/Digital-Wandler „Digidata 1440A“ (Axon Instruments) oder anhand eines „TurboTEC-10CD“ Verstärkers (npi) kombiniert mit einem „Digidata 1200 Series“ als Analog/Digital-Wandler (Axon Instruments) durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die eingesetzten Messelektroden wurden aus Borosilikat-Kapillaren der Sorte „GB 150TF-8P“ (Science Products) mittels eines Pipettenziehers „DMZ-Universal Puller“ (Zeitz) hergestellt. Der verwendete Pipettenwiderstand für TEVC-Messungen betrug 0,5-1,5 MΩ. Sofern nicht anders angegeben, wurde bei allen TEVC-Messungen als extrazelluläre Messlösung ND96 [NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl₂ 1,8 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 5 mM, pH 7,5] verwendet. Die Messpipetten wurden standardmäßig mit 3 M KCl gefüllt. Die Messdaten wurden mittels des Programms „Clampex 10.0“ (Molecular Devices) erfasst. Zur Auswertung diente das Programm „Clampfit 10.0“ (Molecular Devices).

3.9 Zellbiologische Methoden

3.9.1 Zellkulturen

In der Zellkultur wurden HEK-293 und Cos-7 Zellen verwendet. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % (Phelan 2006). Alle eingesetzten Medien wurden vor Gebrauch mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) supplementiert. HEK-293 ist eine humane Zelllinie, bei der DNA-Teile des menschlichen Adenovirus 5 in menschliche embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney cells) transformiert und in deren Erbgut stabil integriert wurden. Der Ursprung der Cos-7 Zellen sind CV-1 Zellen, die aus Nierenfibroblasten des afrikanischen grünen Affen (*Cercopithecus aethiops*) als Zelllinie generiert wurden. Yakov Gluzman entwickelte 1980 aus der CV-1 Zelllinie durch Transformation mit einer "origin"-defekten Mutante des SV-40 Virus (kodiert für das Wildtyp-Virus T-Antigen) die Cos-7 Zelllinie (Gluzman et al. 1980). Sie wächst adhärent in DMEM-Medium und wurde in dieser Arbeit für die Fluoreszenzmikroskopie und die Immunzytochemie verwendet, da die unterschiedlichen Kompartimente in diesen Zellen gut zu unterscheiden sind und der Transport der Kir- und hERG-Proteine an die Plasmamembran gut dargestellt werden kann.

3.9.2 Passagieren von Zellkulturen

Entsprechend ihres Wachstums (zwischen 70-90 % Konfluenz) erfolgte alle 3-5 Tage eine Passagierung der Zellen. Das Kulturmedium wurde von den Zellen entfernt und der Zellrasen mit 5 ml sterilem PBS [140 mM NaCl, 10 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, 2 mM KH₂PO₄] gewaschen, um eventuelle Ca²⁺-Reste, die das Trypsin inhibieren, zu entfernen. Der adhärente Zellrasen wurde vom Boden der Zellkulturflasche durch die Zugabe von 3 ml EDTA-Trypsin-Lösung pro 25ger Flasche bei 37 °C abgelöst und mit 7 ml des entsprechenden Kulturmediums wurde die Reaktion gestoppt. Nach der Überführung der Zellen in ein Falcon erfolgte die Zentrifugation für zwei Minuten bei 1500 rpm. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 3 ml DMEM [1 % PS und 10 % FCS] vorsichtig resuspendiert. Je nach Konfluenz wurden 100-300 µl Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit 5 ml DMEM [1 % PS und 10 % FCS] überführt oder zur Vorbereitung der Transfektion 50-150 µl der Zellen in 2 ml Medium gegeben und auf 35/22 mm Glasbodenschälchen (Willco Wells, Amsterdam) oder Deckgläschen mit einer Konfluenz von 30-50 % ausgesät.

3.9.3 Transiente-Transfektion

Cos-7 Zellen wurden auf 35/22 mm Glasbodenschälchen (Willco Wells, Amsterdam) oder auf Deckgläschen in 2 ml DMEM mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) so ausgesät, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion 30-50 % konfluent waren. Alle verwendeten Medien wurden vor der Transfektion auf RT gebracht. Pro Transfektion wurden 100 µl DMEM-Medium mit 3 µl vorgewärmtem Fugene (Roche) vorsichtig gemischt und der Ansatz 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µg hochreiner Plasmid-DNA und eine Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur. Währenddessen wurde das Kulturmedium in den Glasbodenschälchen gegen DMEM-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) ausgetauscht. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken vermischt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zu weiteren 72 h bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % (Phelan 2006).

3.9.4 Immonozytochemie

Nach entsprechender Expressionszeit erfolgte die Fixierung der transfizierten Zellen für fünf Minuten mit 99 %-igem Methanol (Roth) bei -20 °C. Danach wurde das Methanol abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS (Roth) gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte für fünf Minuten in Permeabilisierungspuffer [1 % BSA, 0,1 % TWEEN in PBS] bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die unspezifischen Bindungen für 1 h bei RT in Blockpuffer [1 % BSA in PBS] blockiert. Der 1. Antikörper EEA1 (Santa Cruz, USA) zur Färbung der frühen Endosomen oder der Antikörper CD63 (Santa Cruz, USA) zur Markierung der späten Endosomen wurde in Blockpuffer in einer Verdünnung 1:100 über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Entfernung des ungebundenen Antikörpers resultierte aus einem dreimaligen Waschschrift für je zwei Minuten mit PBS. Dann wurde der 2. Antikörper Alexa Flour 594 goat anti-Maus für 2-3 min in einer Verdünnung 1:50 bei RT im Dunkeln inkubiert. Auch hier wurden nach der Antikörperbindung die ungebundenen Antikörper durch Waschen mit PBS für dreimal 5 min entfernt, wobei die Zellen weiterhin vor Lichteinstrahlung geschützt blieben.

3.10 Fluoreszenzmikroskopie

3.10.1 Mikroskopie der Zellen

Die gefärbten Zellen wurden mittels eines Olympus IX71 Fluoreszenzmikroskops (Olympus, Germany) mikroskopisch untersucht. Die Aufnahme der Bilder erfolgte durch eine an das Fluoreszenzmikroskop angeschlossene 12 bit CCD Kamera (SensiCam QE). Es wurden 60×N.A. 1.3 PL APO oder 100×N.A. 1.4 PL APO Objektive (Olympus) und die Filter EGFP (Exciter: BP 470/40, Beamsplitter: FT 495, Emitter: BP 525/50), Cy 3 (Exciter: BP 550/25, Beamsplitter: FT 570, Emitter: BP 605/70), DAPI (Exciter: G 365, Beamsplitter: FT 395, Emitter: BP 445/50) verwendet. Während der Aufnahmen wurden die Zellen durch einen Objektheizer (Biophtechs) bei 37 °C gehalten. Zur Auswertung der Bilder wurde die Software Image-Pro® Plus 4.5 (Mediacybernetics) verwendet.

3.11 Statistische Auswertungen

3.11.1 Zweiseitiger T-Test

Zu vergleichende Datensätze wurden anhand des zweiseitigen T-Tests (Microsoft Excel) auf signifikante Unterschiede überprüft. Der T-Test gibt Auskunft darüber, ob die Mittelwerte zweier Datensätze auf dieselbe Population zurückzuführen sind oder sich statistisch voneinander unterscheiden. Der p-Wert als Maß für die Irrtumswahrscheinlichkeit, d.h. für die Wahrscheinlichkeit mit der die verglichenen Daten derselben Population entstammen, wird mit zunehmender Signifikanz kleiner. P-Werte kleiner 0,05 wurden als Zeichen für Signifikanz angesehen und mit einem `*` markiert. `***` deutet einen p-Wert kleiner als 0,01 und `****` einen p-Wert kleiner als 0,001 an.

3.11.2 Kopplungsungleichgewicht „linkage disequilibrium“

Das Kopplungsungleichgewicht oder „linkage disequilibrium“ (LD) ist definiert als die statistische Assoziation zwischen Sequenzvarianten verschiedener Positionen entlang eines Chromosoms (Weiss und Clark 2002). Ein Kopplungsungleichgewicht liegt vor, wenn zwei Loci überzufällig häufig gemeinsam auftreten. Dann weichen die tatsächlich beobachteten Frequenzen von den unter der Annahme der freien Rekombinierbarkeit berechneten Frequenzen ab. Die Tabelle 3.11.2-1 zeigt die Keimzellhäufigkeit zweier Allele.

Tabelle 3.11.2-1 Keimzellhäufigkeit zweier biallelischer Genloki.

		<i>Lokus B</i>		
		B₁	B₂	Gesamt
<i>Lokus A</i>	A₁	f(A ₁ B ₁)	f(A ₁ B ₂)	p ₁
	A₂	f(A ₂ B ₁)	f(A ₂ B ₂)	p ₂
	Gesamt	q ₁	q ₂	1

Das Kopplungsungleichgewicht zwischen zwei Genloki kann durch das Kreuzungsprodukt berechnet werden:

$$\text{Kopplungsungleichgewicht: } D = f(A_1A_2)f(B_1B_2) - f(A_1B_2)f(B_1A_2)$$

Durch das beliebige Benennen der Allele kann D positiv oder negativ ausfallen. Bei vollständiger Kopplung beträgt D -0,25 oder 0,25, das heißt, D liegt immer im numerischen Bereich zwischen -0,25 und +0,25. Um das Kopplungsungleichgewicht weniger allelabhängig auszudrücken, kann der LD-Koeffizient D' bestimmt werden.

$$D' = \frac{D}{D_{\max}}$$

Hierbei entspricht ein Wert von 1 einem hohen Kopplungsungleichgewicht und ein Wert von 0 der Abwesenheit von LD.

4. Ergebnisse

4.1 Identifizierung und Charakterisierung von Mutationen bei Marburger Patienten

In enger Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Grimm, Oberarzt der Abteilung Kardiologie des Universitätsklinikums Gießen Marburg, wurden Arrhythmie-Patienten ausgewählt, bei denen eine genetische Untersuchung erfolgen sollte. Dabei wurden vor allem junge Patienten untersucht, da hier eine genetische Ursache wahrscheinlicher ist. Eine strukturelle Herzerkrankung konnte zuvor ausgeschlossen werden. Von allen Patienten liegt eine Einverständniserklärung vor, in der sie genetischen Untersuchungen zu wissenschaftlichen Zwecken zugestimmt haben. Es wurden von den Patienten zwei Blutproben entnommen und anschließend die DNA aus dem EDTA-Blut isoliert (siehe Abschnitt 3.7.1).

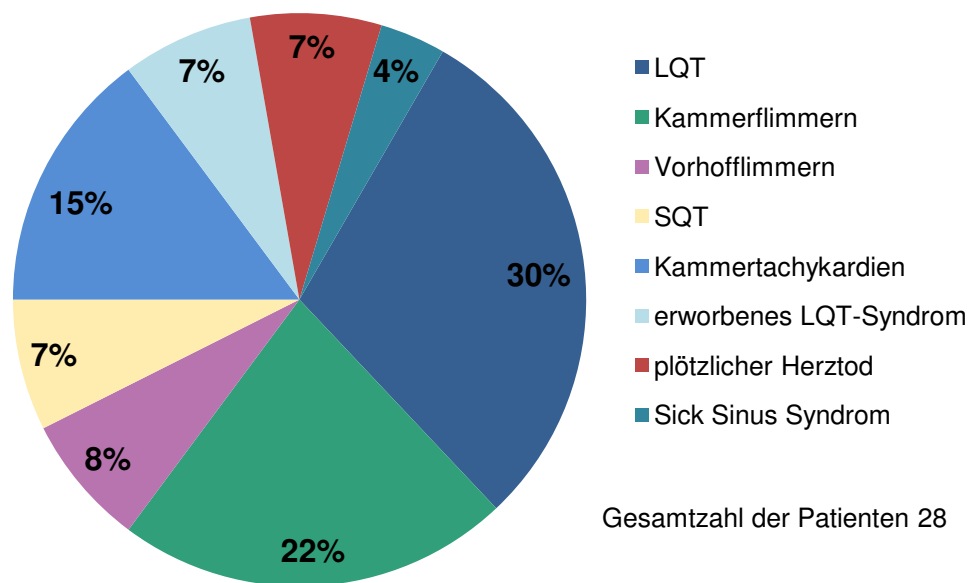


Abbildung 4.1-1: Übersicht über die untersuchten Marburger Patienten.

Die Patienten wurden in enger Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, ausgewählt. Das Kreisdiagramm zeigt die unterschiedlichen Arrhythmien der aufgenommenen Patienten.

In Abbildung 4.1-1 sind die untersuchten Marburger Patienten dargestellt. Insgesamt wurde die genomische DNA von 28 Indexpatienten untersucht. Bei einer Mehrzahl der Patienten konnte ein Langes-QT-Syndrom diagnostiziert werden (30 %). Ebenfalls zeigen viele Patienten Kammerflimmern (22 %) und Kammertachykardien (15 %). Zudem wurden

Patienten mit einem Kurzen-QT-Syndrom, Vorhofflimmern, Sinusknotensyndrom, erworbenem LQT-Syndrom und plötzlichem Herztod untersucht.

Die Identifizierung der Mutationen bei den Patienten erfolgte mit Hilfe der PCR-basierten SSCP-Analyse und im Falle sehr kleiner Gene mittels direkter Sequenzierung. Zeitgleich mit der Auswahl der Patienten wurde mit der Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen für die SSCP-Analyse begonnen. Dabei wurde mit der DNA von Kontrollpersonen gearbeitet. Wie in Abschnitt 3.6.19 beschrieben, wurden die Primer zur Amplifizierung der Exone und der Exon/Intron Grenzen so entworfen, dass das amplifizierte PCR-Produkt 300 bp nicht überschreitet. Bei größeren PCR-Produkten sinkt die Sensitivität der SSCP-Methode. Bei der Etablierung war entscheidend, dass möglichst wenige Nebenprodukte entstehen und die Amplifikation effizient erfolgte. Die PCR- und SSCP-Bedingungen für alle Gene sind im Anhang zusammenfassend dargestellt. Erst nach der Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen wurde mit der Amplifizierung der Patienten-DNA begonnen. Zunächst erfolgte bei den Patienten die Suche nach Mutationen in den klassischen LQT-Genen *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNJ2* und *KCNE*. Neben den bekannten LQT-Genen wurden auch ausgesuchte Kandidatengene *KCNJ8*, *KCNJ14*, *SCN2B*, *KCND3*, *KChIP2*, *KCNK3*, *SCN1A* und der Promoterbereich des *SCN5A*-Gens untersucht.

4.1.1 Identifizierung der H1153Y-Mutation im Exon 15 des *KCNH2*-Gens (Patient 041)

Der 59 Jahre alte Patient 041 zeigt atypisches Vorhofflattern im Wechsel mit typischem Vorhofflattern und hochsymptomatischem und zum Teil asymptomatischem paroxysmalem Vorhofflimmern. Zudem wurde ein Sinusknotensyndrom mit Sinusarresten bis fünf Sekunden Dauer diagnostiziert. Es sind keine strukturellen Herzerkrankungen bekannt. In Abbildung 4.1.1-1 ist exemplarisch ein 12-Kanal Elektrokardiogramm des Patienten dargestellt. Hier zeigt der Patient ein typisches Vorhofflattern mit negativen Sägezähnen in II, III und aVF und einer 2:1 Überleitung mit einer Kammerfrequenz von 146/min bei sonst unauffälligem Stromkurvenverlauf.

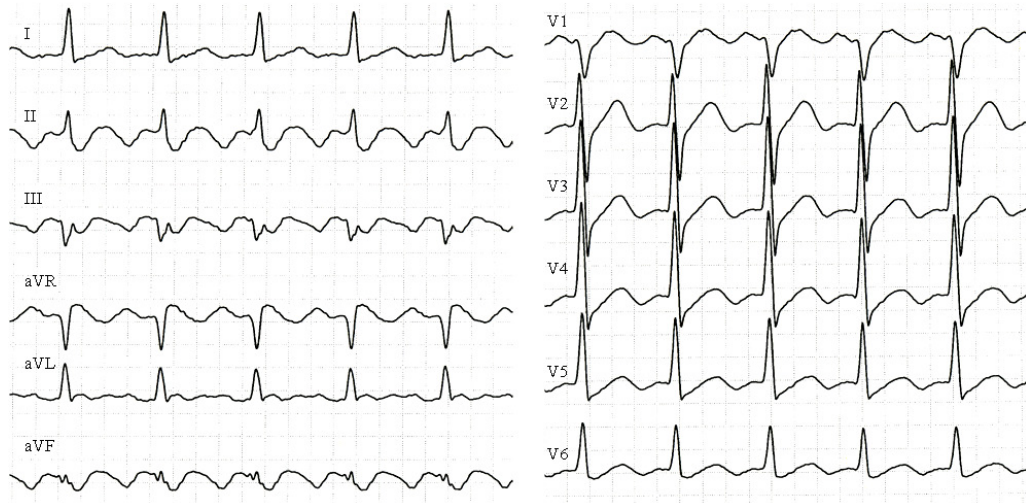


Abbildung 4.1.1-1: 12-Kanal Elektrokardiogramm des Indexpatienten 041.

Das EKG zeigt typisches Vorhofflattern mit negativen Sägezähnen in II, III und aVF und einer 2:1 Überleitung mit einer Kammerfrequenz von 146/min bei sonst unauffälligem Stromkurvenverlauf. Die Laufgeschwindigkeit betrug 50 mm/s.

Bei dem Patienten 041 konnte im Exon 15 des *KCNH2*-Gens ein heterozygoter Aminosäureaustausch von einem Histidin (CAC) zu einem Tyrosin (TAC) festgestellt werden. Zudem wurden der Vater und die beiden Töchter des Indexpatienten untersucht. Die Mutter des Indexpatienten war zum Zeitpunkt der Untersuchungen bereits verstorben. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse und Sequenzierung des Indexpatienten und seiner Familienangehörigen sind in Abbildung 4.1.1-2 dargestellt. Im oberen Bereich des SSCP-Gels sind die einzelsträngigen PCR-Produkte und ganz unten im Gel die doppelsträngigen Produkte zu sehen. Das SSCP-Gel zeigt bei den einzelsträngigen PCR-Produkten eine zusätzliche Bande beim Patienten 041 und einer seiner Töchter (Tochter 2). Rechts ist das Chromatogramm der Sequenzierung gezeigt. Die Sequenzierung erfolgte aus zwei unabhängig voneinander isolierten DNA-Proben, die mittels PCR amplifiziert wurden. Die H1153Y-Mutation konnte bei der Tochter 2 ebenfalls heterozygot nachgewiesen werden. Diese Tochter ist allerdings asymptomatisch und zeigt keine Auffälligkeiten im Belastungs- und Langzeit-EKG. Der Vater des Indexpatienten und die andere Tochter (Tochter 1) tragen die Mutation nicht.

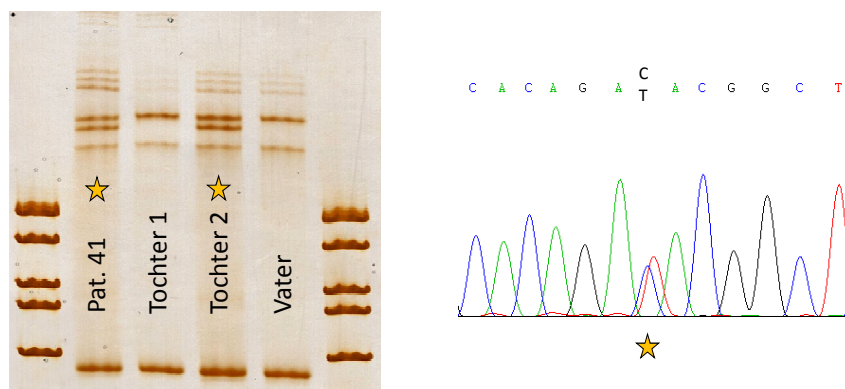


Abbildung 4.1.1-2: Identifizierung der H1153Y-Mutation im Exon 15 des *KCNH2*-Gens.

Die SSCP-Analyse wurde mit einem 10 % T SSCP-Gel, dem Delect-Rehydrierungspuffer bei 15 °C für 80 min durchgeführt. Im SSCP-Gel ist eine zusätzliche Bande beim Indexpatienten 041 und seiner Tochter 2 zu sehen. Dies ist durch einen Stern gekennzeichnet. Die Sequenzierung ergab einen heterozygoten Aminosäureaustausch von Histidin (CAC) zu Tyrosin (TAC) für den Patienten 041 und die Tochter 2. Exemplarisch ist das Sequenzierungsergebnis des Patienten 041 rechts dargestellt. Da die Sequenzierung ein Signal sowohl für ein Cytosin als auch für ein Thymin gibt, liegt der Austausch heterozygot vor.

Die H1153Y-Mutation wurde bereits in früheren Studien bei Patienten mit Langem-QT-Syndrom identifiziert, jedoch nicht physiologisch charakterisiert (Napolitano et al. 2005). Bereits in dieser Veröffentlichung wurde ausgeschlossen, dass es sich um einen Polymorphismus handelt. Es konnten keine weiteren Mutationen bei dem Indexpatienten identifiziert werden. Alle gefundenen Polymorphismen sind in Tabelle 4.1.1-1 zusammenfassend dargestellt. Diese Polymorphismen stehen normalerweise in keinem Zusammenhang mit Arrhythmien oder anderen Krankheiten. Es gibt aber auch Polymorphismen, die mit Arrhythmien assoziiert sind (Pietilä et al. 2002). Der Polymorphismus S38G im Exon1 des *KCNE1*-Gens tritt häufiger bei Patienten mit Vorhofflimmern auf (Lai et al. 2002).

Tabelle 4.1.1-1: Darstellung der identifizierten Polymorphismen des Patienten 041.

Gen	Region	Polymorphismus	Häufigkeit	Sequenz	Referenz
<i>KCNQ1</i>	Intron 13	A>G (homoz.)	0.438	gggtgcc...ggtcctgc	rs163150
<i>KCNH2</i>	Exon 7	L564IL(homoz.)	0.491	cgcactgg...gcctgcatt	rs1805121
<i>SCN5A</i>	Exon 2	A29A (heteroz.)	0.373	tgcttctc...gccatgcg	rs6599230
<i>KCNE1</i>	Exon 1	S38G (heteroz.)	0.439	gccgtcac....gctgcggg	rs17846179
<i>KCNK3</i>	Exon 2	3UTR A>G (homoz.)	ND	cccagagg...cctggagc	rs1663002

Die Nukleotid Nummerierung beginnt mit dem Startcodon ATG (GenBank accession numbers AF000571 [*KCNQ1*], U04270 [*KCNH2*], NM000335 [*SCN5A*], M26685 [*KCNE1*], NM002246 [*KCNK3*]) ND = nicht definiert

4.1.1.1 Lokalisation der H1153Y-Mutation im hERG-Kaliumkanal

In Abbildung 4.1.1-3 ist die Lokalisation der H1153Y-Mutation gezeigt. Die identifizierte Mutation liegt cytoplasmatisch im C-Terminus des Kanals. Insgesamt umfasst der hERG-Kanal 1159 Aminosäuren und die Mutation ist nur sieben Aminosäuren vor dem C-terminalen Ende des Kaliumkanals lokalisiert.

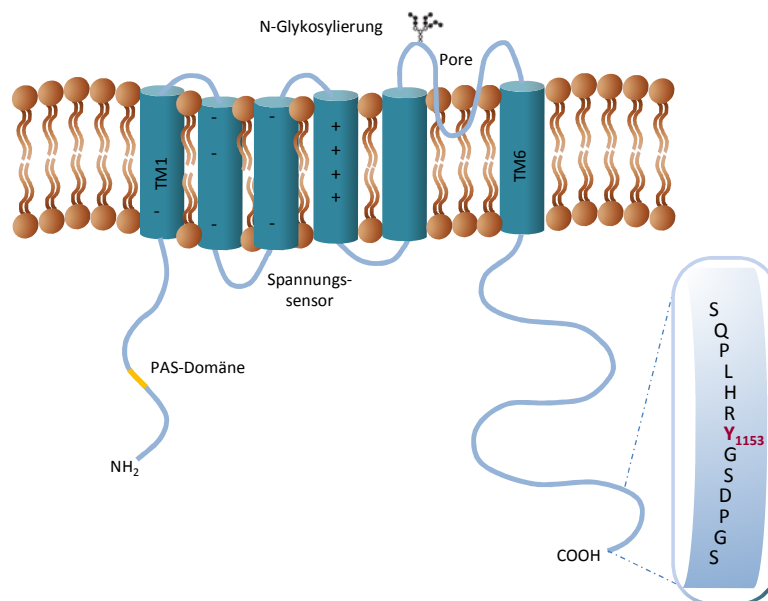


Abbildung 4.1.1-3: Lokalisation der H1153Y-Mutation im hERG-Kaliumkanal.

Die H1153Y-Mutation ist im Zytoplasma und nur sieben Aminosäuren vor dem C-terminalen Ende des hERG-Kanals lokalisiert. In der Vergrößerung ist die Aminosäuresequenz des Kanals illustriert und der Aminosäurerest Tyr¹¹⁵³ rot dargestellt.

4.1.1.2 Funktionelle Charakterisierung der H1153Y-Kanalvariante in *Xenopus* Oozyten

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften des H1153Y-Kanals zu untersuchen, wurden Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt. Untersucht wurden das Strom-Spannungsverhältnis, das instantane Strom-Spannungsverhältnis und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (vgl. 3.8.2). Hierzu wurden *Xenopus* Oozyten mit 15 ng mutierter oder hERG-Wildtyp cRNA injiziert. Da die Mutation bei dem Patienten 041 heterozygot vorliegt, wurde der mutierte Kanal zudem zusammen mit dem WT-Kanal koinjiziert (7,5 ng WT + 7,5 ng H1153Y). Die Messung der Ströme erfolgte 48 h nach der Injektion. Mithilfe einer Strom-Spannungskurve ließen sich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals darstellen (Abbildung 4.1.1-4). Das Haltepotential betrug -80 mV. Danach wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -60 mV und +20 mV in 10 mV

Abständen für je 1 s durchgeführt. Nach den Testpulsen schloss sich ein 2 s langer Nachpuls auf -70 mV an. Der rechte Teil der Abbildung 4.1.1-4 zeigt repräsentative Ströme des hERG-WT und des H1153Y mutierten Kanals. Bei Depolarisation aktiviert der hERG-Kanal. Aufgrund der einsetzenden C-Typ Inaktivierung ist die Stromgröße jedoch relativ gering. Der anschließende Nachpuls bewirkt eine schnelle Erholung von der Inaktivierung, jedoch schließen die hERG-Kanäle nur langsam, so dass größere „tail“-Ströme über die Membran aufgezeichnet werden können. Die „tail“-Ströme beschreiben die Deaktivierung der Kanäle. Die Injektion von 15 ng WT cRNA resultiert in Strömen, die doppelt so groß sind wie die Ströme, die durch die Injektion von 7,5 ng WT cRNA beobachtet werden. Die H1153Y-Kanalvariante zeigt Ströme, die signifikant kleiner als die Ströme des WT-Kanals sind. Die Koexpression des mutierten Kanals mit dem WT-Kanal führt zu größeren Strömen, als die Expression von 50 % WT (7,5 ng). Die H1153Y-Kanalvariante hat somit keinen dominant negativen Effekt auf den WT-Kanal.

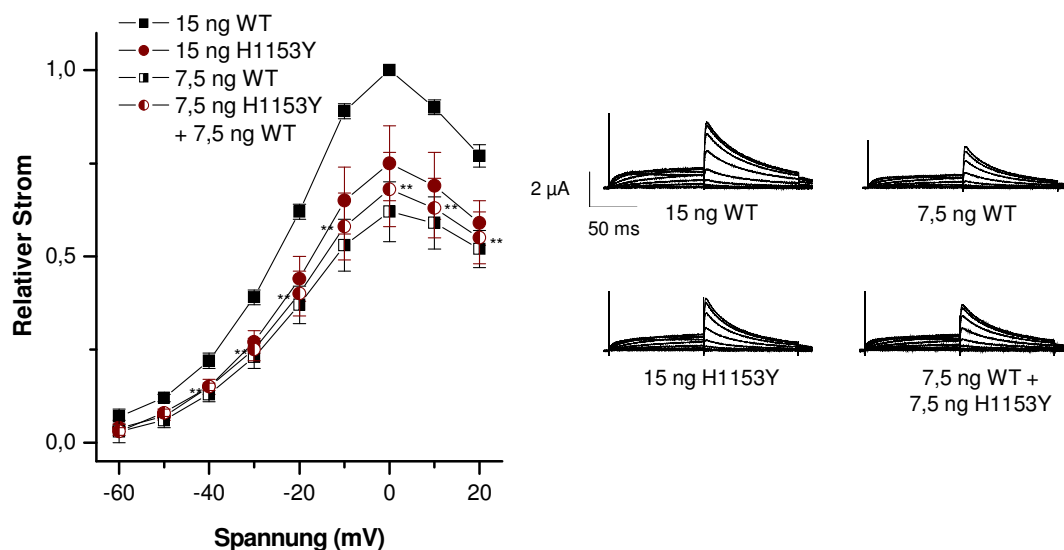


Abbildung 4.1.1-4: Einfluss der H1153Y-Mutation auf das Strom-Spannungsverhältnis des hERG-Stroms.

Xenopus Oozyten wurden mit 15 ng WT oder mutierter hERG cRNA injiziert und nach zwei Tagen Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (n=30). Um zu überprüfen, ob die mutierten hERG-Kanäle einen dominant negativen Effekt ausüben, wurden 7,5 ng WT cRNA allein oder 7,5 ng WT cRNA mit 7,5 ng mutierter cRNA koinjiziert (n=18). Das Haltepotential betrug -80 mV. Davon ausgehend wurden Spannungsprünge zu Potentialen zwischen -60 mV und +20 mV in 10 mV Abständen für je 1 s durchgeführt und danach das Potential bei -70 mV gehalten. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines T-Tests ermittelt und ist durch ein oder zwei Sterne gekennzeichnet. Links in der Abbildung sind die Strom-Spannungskurven und rechts repräsentative Ströme der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme dargestellt.

Zudem wurde Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung (G/V) aus den „tail“-Strömen des hERG-Kanals mit Hilfe desselben Spannungsprotokolls bestimmt (Abbildung 4.1.1-5). Durch Auftragen der „tail“-Stromamplitude gegen die Spannung der vorangegangenen Depolarisation erhielt man die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung, die sich in einer Strom-Spannungskurve darstellen ließ. Um die einzelnen Messungen unabhängig von der jeweiligen Expression miteinander vergleichen zu können, wurden alle Werte auf ihre maximale Amplitude normiert. Der relative Strom wurde gegen die Spannung in mV aufgetragen. Der mutierte Kanal zeigt keine Veränderungen in der Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung.

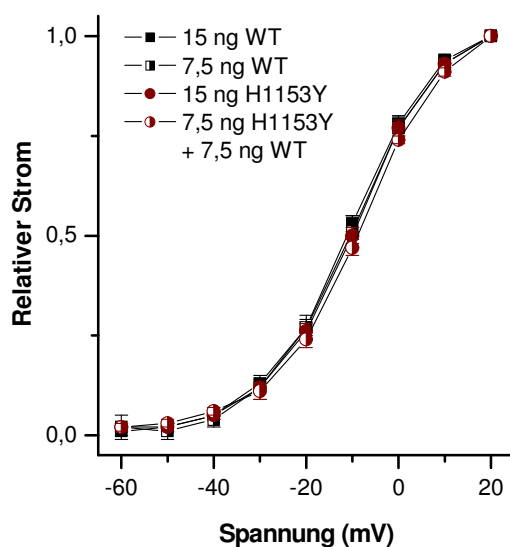


Abbildung 4.1.1-5: Einfluss der H1153Y-Mutation auf das Leitfähigkeits-Spannungsverhältnis des hERG-Stroms.

Xenopus Oozyten wurden mit 15 ng WT oder mutierter hERG cRNA injiziert und nach zwei Tagen Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (n=15). Das Haltepotential betrug -80 mV. Davon ausgehend wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -60 mV und +20 mV in 10 mV Abständen für je 1 s durchgeführt und folgend das Potential bei -70 mV gehalten.

Um das instantane Strom-Spannungsverhältnis des hERG-Stroms zu untersuchen, wurde ein weiteres Protokoll angewendet. Nach einer Voraktivierung auf +40 mV für 1 s erfolgten Spannungssprünge auf Testpotentiale in 10 mV Abständen von -120 mV bis +30 mV für 3 s. Mit Hilfe dieses Protokolls werden alle Kanäle geöffnet, so dass die Leitfähigkeiten der instantanen Ströme bei verschiedenen Potentialen nach der erfolgten Voraktivierung gemessen werden konnten (Abbildung 4.1.1-6). Hierbei wird auch der einwärtsrektifizierende Charakter des hERG-Kanals deutlich. Auch der vollständig aktivierte H1153Y-Strom ist signifikant kleiner als der WT-Strom. Ebenso zeigt der H1153Y-Kanal koexprimiert mit dem WT-Kanal einen geringeren vollkommen aktivierten Strom.

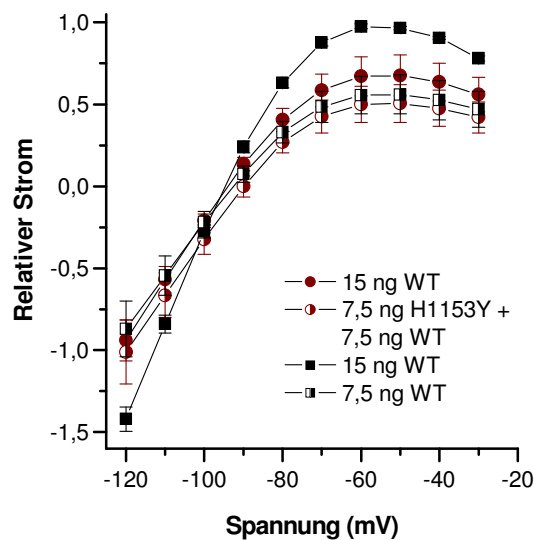


Abbildung 4.1.1-6: Einfluss der H1153Y-Mutation auf das instantane Strom-Spannungsverhältnis des hERG-Stroms.

Xenopus Oozyten wurden mit 15 ng WT oder mutierter hERG cRNA injiziert und 48 h nach der Injektion Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (n=19). Das Haltepotential betrug -80 mV. Davon ausgehend wurde der Kanal für 1 s bei +40 mV voraktiviert und anschließend wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -120 mV und -30 mV in 10 mV Abständen für je 3 s durchgeführt.

Der H1153Y mutierte Kanal zeigt Ströme, die signifikant kleiner als die WT-Ströme sind. Auch die vollständig aktivierten Ströme sind signifikant erniedrigt. Die H1153Y-Kanalvariante zeigt keinen dominant negativen Effekt auf den WT-Kanal. Zudem können keine Veränderungen in der Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung beobachtet werden.

4.1.1.3 Oberflächenexpression des hERG H1153Y-Kanals in *Xenopus* Oozyten

Mutationen im hERG-Kaliumkanal können zu einem Funktionsverlust führen, der auf einem veränderten Öffnungsverhalten oder einem gestörten Transport an die Plasmamembran basiert (Delisle et al. 2004). Die Bestimmung der Oberflächenexpression des H1153Y-Kanals in *Xenopus* Oozyten erfolgte mittels eines Chemilumineszenz-Versuches (Zerangue et al. 1999), wie in Abschnitt 3.6.18 beschrieben. Hierzu wurde das hERG-WT-HA Konstrukt von Huang *et al.* verwendet, welches zwischen den Aminosäureresten G⁵¹⁶ und S⁵¹⁷ ein modifiziertes Hämagglutinin (HA)-Epitop aufweist (Huang et al. 2001). In das hERG-H1153Y Konstrukt wurde ebenfalls ein Hämagglutinin (HA)-Epitop eingeführt. 15 ng WT oder mutierte hERG cRNA wurde in Oozyten injiziert und das Chemilumineszenzsignal nach zwei Tagen luminometrisch quantifiziert. Die Ergebnisse sind in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben und wurden auf die WT-Werte normiert (Abb 4.1.1-7). Die RLU-Werte

spiegeln die Oberflächenexpression der Kanäle wieder. Als Negativkontrolle dienten mit Wasser injizierte Oozyten. Die H1153Y-Kanalvariante zeigt keine Veränderung in der Oberflächenexpression. Die RLU-Werte entsprechen den für den WT-Kanal gemessenen Werten. In *Xenopus* Oozyten wird der mutierte Kanal somit unverändert an die Oberfläche transportiert und zeigt keinen gestörten Transport an die Plasmamembran.

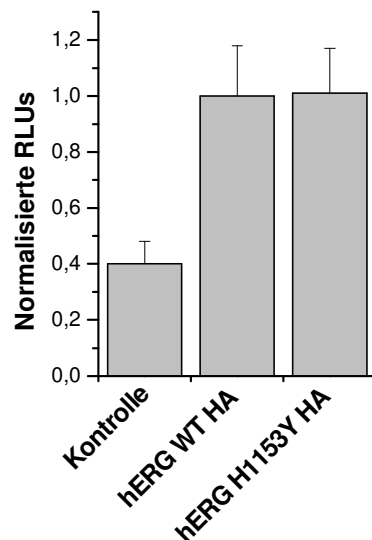


Abbildung 4.1.1-7: Oberflächenexpression des hERG H1153Y-Kanals in *Xenopus* Oozyten.

Um die Oberflächenexpression zu quantifizieren, wurde das hERG-WT-HA Konstrukt von Huang *et al.* verwendet, in das hERG-H1153Y Konstrukt ein extrazelluläres HA-Epitop eingeführt und die Expression mit einem Chemilumineszenz-Versuch bestimmt. Hierzu wurde 15 ng WT oder mutierte hERG cRNA in Oozyten injiziert und die Expression nach zwei Tagen luminometrisch ermittelt. Die Ergebnisse sind in relativen Lichteinheiten (RLU) über einen Zeitraum von einer Sekunde angegeben. Es sind die Mittelwerte von 30 Oozyten an zwei unabhängigen Messtagen dargestellt. Als Negativkontrolle dienten mit Wasser injizierte Oozyten.

4.1.1.4 Transport der hERG-Kanäle an die Zellmembran

Kanäle mit Mutationen können einen defizienten Transport an die Zellmembran in Säugerzellen aufweisen, auch wenn sie in *Xenopus* Oozyten eine unveränderte Oberflächenexpression zeigen. Daher wurde der Transport an die Zellmembran für die H1153Y-Kanalvariante mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie, wie in 3.10.1 beschrieben, untersucht. Alle Versuche wurden in Cos-7 Zellen durchgeführt, da bei diesen Zellen die unterschiedlichen Kompartimente gut zu unterscheiden sind.

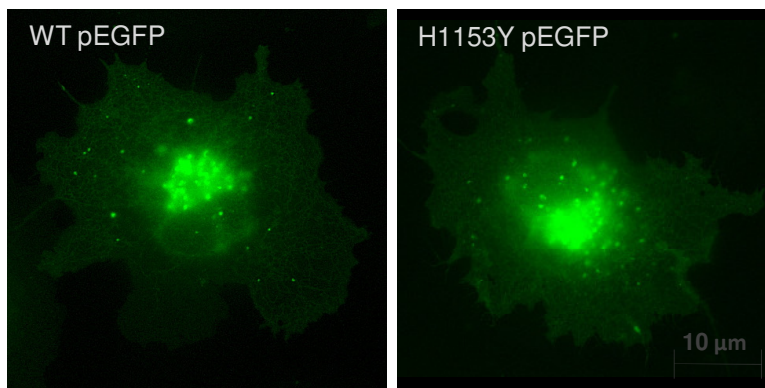


Abbildung 4.1.1-8: Zelluläre Lokalisation der hERG-Kanäle in Cos-7 Zellen.

Cos-7 Zellen wurden mit 1 µg pEGFP-hERG-C3-WT oder pEGFP-hERG-C3-H1153Y Konstrukten transfiziert und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Nach 24 h wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation der WT und des mutierten hERG-Kanals verglichen. Der WT und H1153Y hERG-Kanal zeigen eine Fluoreszenz im Bereich des Endoplasmatischen Retikulums und der Plasmamembran. Die Bilder wurden in einer 63 x Vergrößerung aufgenommen.

Um die Lokalisation der H1153Y-Kanalvariante zu bestimmen, wurden Cos-7 Zellen mit 1 µg pEGFP-hERG-WT und pEGFP-hERG-H1153Y, wie in Abschnitt 3.9.3 beschrieben, transfiziert und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % bei 37 °C kultiviert. Nach 8 h, 16 h, 24 h und 36 h wurde der Transport der hERG-WT und H1153Y-Kanäle an die Zellmembran mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt (Daten nicht gezeigt). Nach 24 h zeigen die hERG-Kanäle eine deutliche Fluoreszenz an der Plasmamembran (Abbildung 4.1.1-8). Der hERG-WT (links) und der H1153Y mutierte Kanal (rechts) zeigen eine Fluoreszenz an der Plasmamembran. Die H1153Y-Mutation wird folglich auch in Säugerzellen unverändert an die Plasmamembran transportiert.

4.1.2 Identifizierung der G269S-Mutation im Exon 6 des *KCNQ1*-Gens (Patient 010)

Bei der operativen Versorgung einer Mittelfußfraktur konnte bei dem Patienten 010 zufällig ein Langes-QT-Syndrom diagnostiziert werden. In Abbildung 4.1.2-1 ist ein 12-Kanal Elektrokardiogramm des Patienten dargestellt. Es ist ein verlängertes QT-Intervall von 0,44 Sekunden messbar. Die frequenzkorrigierte QT-Zeit (QT_c) beträgt 0,49 Sekunden.

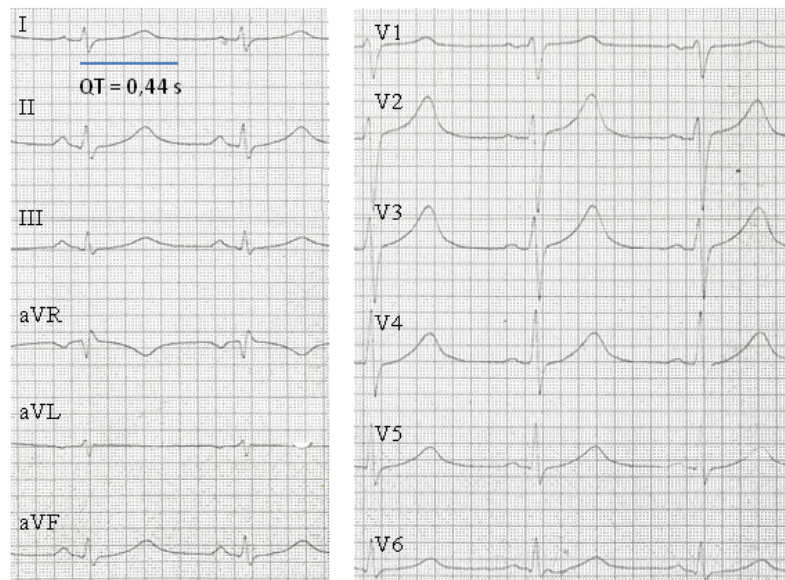


Abbildung 4.1.2-1: Schematische Darstellung des 12-Kanal Elektrokardiogramms des Indexpatienten 010.

Das EKG zeigt eine verlängerte QT-Zeit von 0,44 Sekunden bei ansonsten unauffälligem Stromkurvenverlauf. Die Laufgeschwindigkeit betrug 50 mm/s. Daraus ergibt sich eine frequenzkorrigierte QT-Zeit (QT_c) von 0,49 Sekunden.

Bei dem Patienten 010 konnte im Exon 6 des *KCNQ1*-Gens ein heterozygoter Aminosäureaustausch von einem Glycin (GGC) zu einem Serin (AGC) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse und Sequenzierung sind in Abbildung 4.1.2-2 dargestellt. Im Vergleich mit den anderen analysierten Patienten zeigt das SSCP-Gel bei dem Patienten 010 ein anderes Bandenmuster mit einer zusätzlichen Bande. Das Sequenzierungsergebnis des nicht-kodierenden Stranges ist rechts in der Abbildung gezeigt. Der Austausch konnte in zwei unabhängig voneinander isolierten DNA-Proben, die mittels PCR amplifiziert wurden, in beiden Strängen nachgewiesen werden.

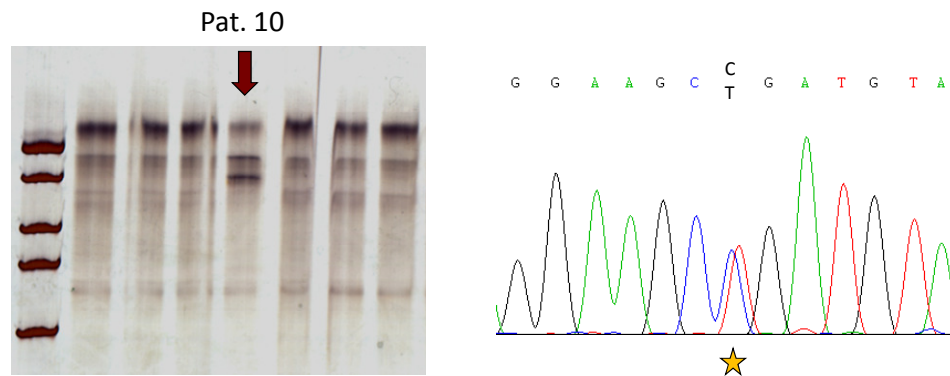


Abbildung 4.1.2-2: Identifizierung der G269S-Mutation im Exon 6 des *KCNQ1*-Gens.

Links in der Abbildung ist das Ergebnis der SSCP-Analyse gezeigt. Die SSCP-Analyse wurde mit einem 10 % T SSCP-Gel bei 15 °C für 90 min durchgeführt. Die Rehydrierung des Gels erfolgte für zweimal 40 min in DISK-Puffer. Im SSCP-Gel zeigt der Patient 010 (roter Pfeil) ein Bandenmuster, das von dem der anderen analysierten Patienten abweicht. Zur Identifizierung der Mutation wurde das amplifizierte PCR-Produkt sequenziert. Rechts ist das Ergebnis der Sequenzierung des nicht-kodierenden Strangs gezeigt. In dem dargestellten Sequenzabschnitt wurde ein heterozygoter Cytosin-zu-Thymin Nukleotidaustausch identifiziert (Stern). Diese Veränderung bewirkt einen Aminosäureaustausch von Glycin (GGC) zu Serin (AGC).

Die G269S-Mutation wurde bereits zuvor bei Patienten mit Langem-QT-Syndrom nachgewiesen (Murray et al. 2002; Choi et al. 2004; Ackerman et al. 1999; Chen et al. 2003; Creighton et al. 2006). Bei dem Patienten 010 konnten keine weiteren Mutationen identifiziert werden. Alle identifizierten Polymorphismen sind in Tabelle 4.1.2-1 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4.1.2-1: Darstellung der gefundenen Polymorphismen des Patienten 010.

Gen	Region	Polymorphismus	Häufigkeit	Sequenz	Referenz
<i>KCNQ1</i>	Exon 7	I328I (heteroz.)	0.005	ggaagacc...gcctcctg	(Gouas et al. 2005)
	Intron 13	A>G (homoz.)	0.438	gggtgcc...ggtcctgc	rs163150
<i>KCNH2</i>	Exon 6	I489I (heteroz.)	0.454	ccggccgc...gccgtcca	rs740952
		F508F (heteroz.)	-	ccatcccc...gacctgct	neu
<i>SCN5A</i>	Exon 7	L564L(homoz.)	0.491	cgcactgg...gcctgcatt	rs1805121
	Promoter	T-834C (heteroz.)	0.17	cgcgcgcg...gtgtgggt	(Yang et al. 2008)
	Intron 24	IVS24+53 T>C (heteroz.)	0.05	tcctgg...tgcttg	(Aydin et al. 2005)
<i>KCNE1</i>	Exon 1	S38G (heteroz.)	0.439	gccgtcac....gctgcggg	rs17846179
<i>KCNJ14</i>	Exon 3	A431V (homoz.)	?	ccaaccctgg...gctgaccctg	rs73050908
<i>KCNK3</i>	Exon 2	3UTR A>G (homoz.)	ND	cccgaggg...cctggagc	rs1663002

Die Nukleotid Nummerierung beginnt mit dem Startcodon ATG (GenBank accession numbers AF000571 [*KCNQ1*], U04270 [*KCNH2*], NM000335 [*SCN5A*], M26685 [*KCNE1*], NM013348 [*KCNJ14*], NM002246 [*KCNK3*]) ND = nicht definiert

4.1.2.1 Lokalisation der G269S-Mutation im KvLQT1-Kanal

In Abbildung 4.1.2-3 ist die Lokalisation der G269S-Mutation im KvLQT1-Kanal dargestellt. Dabei zeigt der linke Teil der Abbildung den schematischen Aufbau und der rechte Teil das dreidimensionale Strukturmodell des Kanals. Dieses Strukturmodell basiert hauptsächlich auf der Struktur des Ratten Kv1.2-Kanals (Smith et al. 2007). Die identifizierte Mutation liegt im vorderen Bereich des S5-Segments des Kanals. Das S5-Segment bildet zusammen mit dem S6-Segment die kaliumselektive Pore.

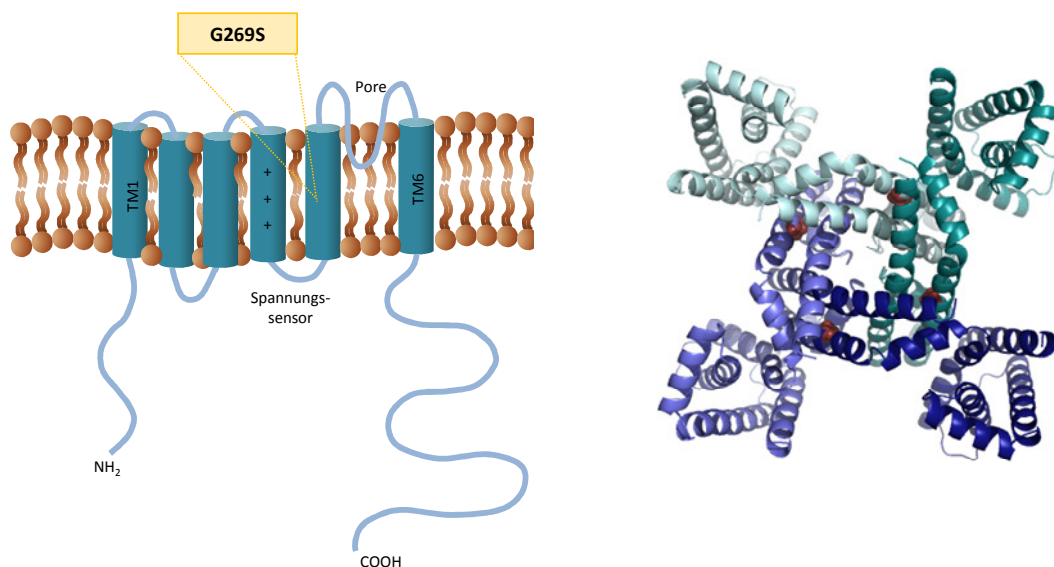


Abbildung 4.1.2-3: Lokalisation der G269S-Mutation im KvLQT1-Kanal.

Die identifizierte G269S-Mutation ist im S5-Segment des KvLQT1-Kanals lokalisiert. Zusammen mit dem S6-Segment bildet das S5-Segment die kaliumselektive Pore. Links ist das offene dreidimensionale Strukturmodell des KvLQT1-Kanals nach Smith *et al.* dargestellt. Der Aminosäurerest Gly²⁹⁶ ist hier rot hervorgehoben.

Innerhalb der *KCNQ*-Familie ist der Glycinrest an Position 269 im S5-Segment hoch konserviert. In Abbildung 4.1.2-4 ist der Sequenzvergleich der verschiedenen *KCNQ*-Kanäle gezeigt. Dabei ist der Glycinrest gelb hinterlegt.

	G269S
KCNQ2	QILRMIRMDRRGGTWKLLGSVVYAHSKELVTAWYI G FLCLILASFLVYLAEKGE
KCNQ4	QILRMVRMDRRGGTWKLLGSVVYAHSKELITAWYI G FLVLIFASFLVYLAEKDA
KCNQ3	QILRMLRMDRRGGTWKLLGSAICAHSKELITAWYI G FLTLILSSFLVYLVEKDV
KCNQ1	QILRMLHVDROGGTWRLLGSVVF IHRQEL I TTLYI G FLGLIFSSYFVYLAEKDA
	S4 S5

Abbildung 4.1.2-4: Konservierung der G269S-Mutation innerhalb der *KCNQ*-Familie.

Gezeigt ist ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs verschiedener *KCNQ*-Kanäle. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW (European Bioinformatics Institute) erstellt. Das Glycin an Position 269 befindet sich im S5-Segment und ist innerhalb der *KCNQ*-Familie hoch konserviert.

4.1.2.2 Funktionelle Charakterisierung der G269S-Kanalvariante in *Xenopus* Oozyten

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften des G269S-Kanals zu untersuchen, wurden Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (vgl. 3.8.2). Hierzu wurden *Xenopus* Oozyten mit 14,5 ng mutierter oder KvLQT1-WT cRNA injiziert. Da die Mutation bei dem Patienten heterozygot vorliegt, wurde der mutierte Kanal zudem zusammen mit dem WT-Kanal koinjiziert (7,25 ng WT + 7,25 ng G269S). Die Messung der Ströme erfolgte drei Tage nach der Injektion (Abbildung 4.1.2-5). Das Haltepotential betrug -80 mV. Davon ausgehend wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -60 mV und +60 mV in 20 mV Abständen für je 3 s durchgeführt.

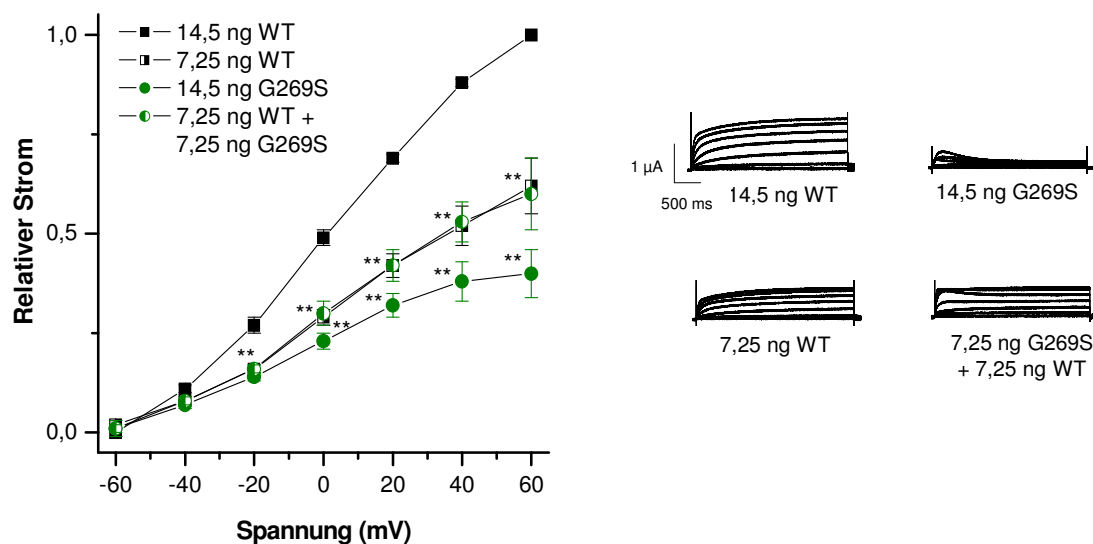


Abbildung 4.1.2-5: Einfluss der G269S-Mutation auf das Strom-Spannungsverhältnis des KvLQT1-Stroms.

Xenopus Oozyten wurden mit 14,5 ng WT oder 14,5 ng mutierter KvLQT1 cRNA injiziert und an Tag drei nach der Injektion Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (n=27). Um zu überprüfen, ob die mutierten KvLQT1-Kanäle einen dominant negativen Effekt ausüben, wurden 7,25 ng WT cRNA allein oder 7,25 ng WT cRNA mit 7,25 ng mutierter cRNA koinjiziert (n=21). Das Haltepotential betrug -80 mV. Davon ausgehend wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -60 mV und +60 mV in 20 mV Abständen für je 3 s durchgeführt. Links in der Abbildung sind die Strom-Spannungskurven und rechts repräsentative Ströme der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines T-Tests ermittelt und ist durch ein oder zwei Sterne gekennzeichnet.

Mithilfe einer Strom-Spannungskurve ließen sich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals darstellen. Der rechte Teil der Abbildung zeigt repräsentative Ströme des KvLQT1-WT und der G269S mutierten Kanäle. Die Injektion von 14,5 ng WT cRNA resultiert in Strömen, die doppelt so groß sind wie die Ströme, die durch die Injektion von 7,25 ng WT cRNA beobachtet werden. Die G269S-Mutation allein (grün) zeigt Ströme, die signifikant kleiner als die Ströme des WT-Kanal sind. Die gemessenen Ströme liegen

unterhalb des Stroms von 50 % WT (7,25 ng). Koinjiziert mit WT cRNA ist der Strom nicht von dem Strom von 50 % WT zu unterscheiden. Die G269S-Mutation hat somit keinen dominant negativen Effekt auf den WT-Kanal.

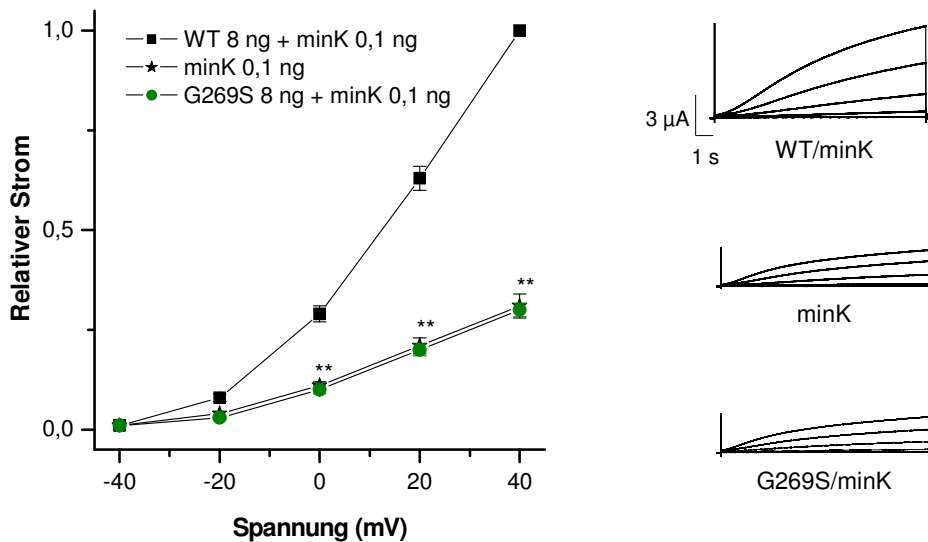


Abbildung 4.1.2-6: Einfluss der G269S-Mutation auf das Strom-Spannungsverhältnis des I_{Ks} -Stroms.

Xenopus Oozyten wurden mit 8 ng WT oder mutierter KvLQT1 cRNA und mit 0,1 ng minK cRNA koinjiziert und nach drei Tagen Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (n=18-19). Das Haltepotential betrug -80 mV. Davon ausgehend wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -40 mV und +40 mV in 20 mV Abständen für je 7 s durchgeführt. Links in der Abbildung sind die Strom-Spannungskurven und rechts die repräsentativen Ströme der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme dargestellt.

In kardialen Myozyten assembliert der KvLQT1-Kanal mit der *KCNE1* β -Untereinheit (minK) und zeigt einen Strom, der dem verzögerten, auswärts gerichteten Kaliumstrom I_{Ks} im Herzen entspricht. Um zu überprüfen, ob der I_{Ks} -Strom verändert ist, wurden Oozyten mit 8 ng WT oder mutierter KvLQT1 cRNA zusammen mit 0,1 ng minK cRNA koinjiziert. Die Messung der Ströme erfolgte drei Tage nach der Injektion. Das Haltepotential betrug -80 mV. Davon ausgehend wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -40 mV und +40 mV in 20 mV Abständen für je 7 s durchgeführt. Mithilfe einer Strom-Spannungskurve ließen sich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals darstellen (Abbildung 4.1.2-6). *Xenopus* Oozyten besitzen einen endogenen KvLQT1-Kanal (Sanguinetti et al. 1996). Bei der Injektion von minK alleine assembliert die minK β -Untereinheit mit dem endogenen KvLQT1-Kanal und zeigt ebenfalls einen I_{Ks} -Strom. Zusammen mit minK zeigt der G269S (grün) mutierte Kanal im Vergleich zum WT-Kanal einen I_{Ks} -Strom, der dem Strom von 0,1 ng minK entspricht. Der G269S mutierte Kanal zeigt einen kompletten Verlust der

Assoziation mit der β -Untereinheit minK. Ein I_{Ks} -Stroms ist wahrscheinlich nur aufgrund des endogenen KvLQT1 sichtbar.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur der KvLQT1-Strom gegenüber dem WT-Strom signifikant reduziert ist, sondern auch die Assemblierung des mutierten Kanals mit der β -Untereinheit minK defekt ist.

4.1.3 Identifizierung des H558R- und des IVS9-3-C>A-Polymorphismus im Exon 12 und Intron 9 des *SCN5A*-Gens (Patient 040)

Der Patient 040 zeigt monomorphe Kammertachykardien mit Verdacht auf Mikroreentry im posterioren linken Ventrikel. Nach Amiodaronaufsättigung traten rezidivierende *Torsade de pointes* Tachykardien und Kammerflimmern bei dem Longen-QT-Syndrom auf.

Bei dem Patienten 040 konnte im Exon 12 des *SCN5A*-Gens ein homozygoter Aminosäureaustausch von einem Histidin (CAC) zu einem Arginin (CGC) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse und Sequenzierung sind in Abbildung 4.1.3-1 dargestellt. Das SSCP-Gel zeigt im Vergleich mit den anderen Patienten eine zusätzliche Bande beim Patienten 040. Das Sequenzierungsergebnis des kodierenden Stranges ist rechts in der Abbildung gezeigt. Der Austausch konnte in zwei unabhängig voneinander isolierten DNA Proben, die mittels PCR amplifiziert wurden, nachgewiesen werden.

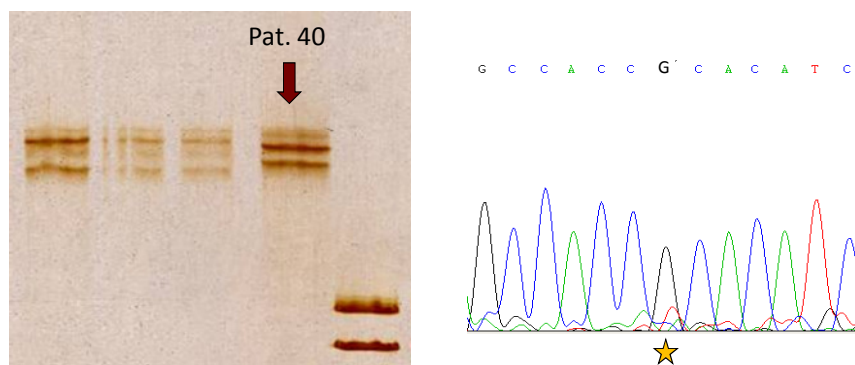


Abbildung 4.1.3-1: Identifizierung des homozygoten Polymorphismus H558R im Exon 12 des *SCN5A*-Gens.

Links in der Abbildung ist das Ergebnis der SSCP-Analyse gezeigt. Die SSCP-Analyse wurde mit einem 10 % T SSCP-Gel bei 15 °C für 90 min durchgeführt. Die Rehydrierung des Gels erfolgte für zweimal 40 min in Delect-Puffer. Im SSCP-Gel zeigt der Patient 40 (roter Pfeil) ein deutlich anderes Bandenmuster. Zur Identifizierung des Polymorphismus wurde das amplifizierte PCR-Produkt sequenziert. Rechts ist das Ergebnis der Sequenzierung des kodierenden Strangs gezeigt. In dem dargestellten Sequenzabschnitt wurde ein homozygoter Adenin-zu-Guanin Nukleotidustausch identifiziert (Stern). Diese Veränderung bewirkt einen Aminosäureaustausch von Histidin (CAC) zu Arginin (CGC).

Zudem konnte beim Patienten ein homozygoter Cytosin-zu-Adenin Nukleotidaustausch an der Position -3 im Intron 9 des *SCN5A*-Gens nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der SSCP-Analyse und der Sequenzierung sind in Abbildung 4.1.3-2 dargestellt. Das SSCP-Gel zeigt im Vergleich mit den anderen analysierten Patienten eine Verschiebung der Bande beim Patienten 040. Das Sequenzierungsergebnis des nicht-kodierenden Strangs ist rechts in der Abbildung gezeigt. Der Austausch konnte in zwei unabhängig voneinander isolierten DNA-Proben nachgewiesen werden. Das Cytosin an der Position -3 ist an der 3`Spleißstelle zu

78 % konserviert (Padgett et al. 1986). Ein Austausch zu Adenin könnte das Spleißing verändern.

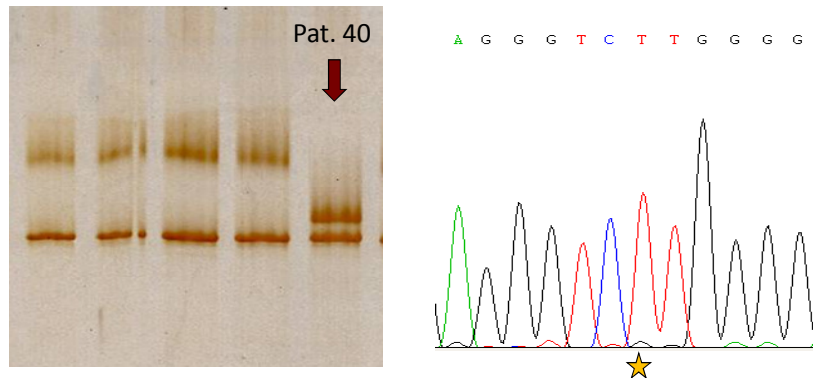


Abbildung 4.1.3-2: Identifizierung des homozygoten Polymorphismus IVS9-3-C>A im Intron 9 des SCN5A-Gens.

Links in der Abbildung ist das Ergebnis der SSCP-Analyse gezeigt. Die SSCP-Analyse wurde mit einem 10 % T SSCP-Gel bei 15 °C für 90 min durchgeführt. Die Rehydrierung des Gels erfolgte für zweimal 40 min in Delect-Puffer. Im SSCP-Gel zeigt der Patient 40 (roter Pfeil) ein anderes Bandenmuster. Zur Identifizierung des Polymorphismus wurde das amplifizierte PCR-Produkt sequenziert. Rechts ist das Ergebnis der Sequenzierung des nicht-kodierenden Strangs gezeigt. In dem dargestellten Sequenzabschnitt wurde ein homozygoter Guanin-zu-Thymin Nukleotidaustausch identifiziert (Stern). Diese Veränderung bewirkt im kodierenden Strang einen Cytosin-zu-Adenin Nukleotidaustausch und könnte das Spleißing verändern.

Der H558R-Polymorphismus (Aydin et al. 2005; Iwasa et al. 2000; Yang et al. 2002; Takahata et al. 2003) und auch der Polymorphismus IVS9-3-C>A (Gouas et al. 2005) wurden bereits zuvor beschrieben. Es konnten bei dem Patienten 040 keine Mutationen identifiziert werden. Alle gefundenen Polymorphismen sind in Tabelle 4.1.3-1 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4.1.3-1: Darstellung der identifizierten Polymorphismen des Patienten 040.

Gen	Region	Polymorphismus	Häufigkeit	Sequenz	Referenz
<i>KCNQ1</i>	Exon 8	A380A (heteroz.)	0.045	atcccggc...gcagcctc	rs 1805118
	Intron 13	A>G (homoz.)	0.438	gggtgccc...ggtcctgc	rs163150
<i>KCNH2</i>	Exon 6	I489I (heteroz.)	0.454	ccggccgc...gccgtcca	rs740952
		F508F (heteroz.)	-	ccatcccc...gacctgct	neu
	Exon 7	L564L (homoz.)	0.491	cgcactgg...gcctgcatt	rs1805121
<i>SCN5A</i>	Intron 9	IVS9-3 C>A (homoz.)	-	tgctcccc...agaccctc	Gouas <i>et al.</i> , 2005
	Exon12	H558R (homoz.)	0.05	gagccacc...cacatcac	rs1805124
<i>KCNE1</i>	Exon 1	S38G (heteroz.)	0.439	gccgtcac....gctgcggg	rs17846179
<i>KCNK3</i>	Exon 2	3UTR A>G (homoz.)	N.D.	cccgaggg...cctggagc	rs1663002

Die Nukleotid Nummerierung beginnt mit dem Startcodon ATG (GenBank accession numbers AF000571 [*KCNQ1*], U04270 [*KCNH2*], NM000335 [*SCN5A*], M26685 [*KCNE1*], NM002246 [*KCNK3*]) ND = nicht definiert

4.1.3.1 Lokalisation des H558R-Polymorphismus im Nav1.5-Natriumkanal

In der Abbildung 4.1.3-3 ist die Lokalisation des H558R-Polymorphismus gezeigt. Der nichtsynonyme H558R-Polymorphismus ist im zytoplasmatischen Linker zwischen der Domäne DI und DII des Natriumkanal lokalisiert.

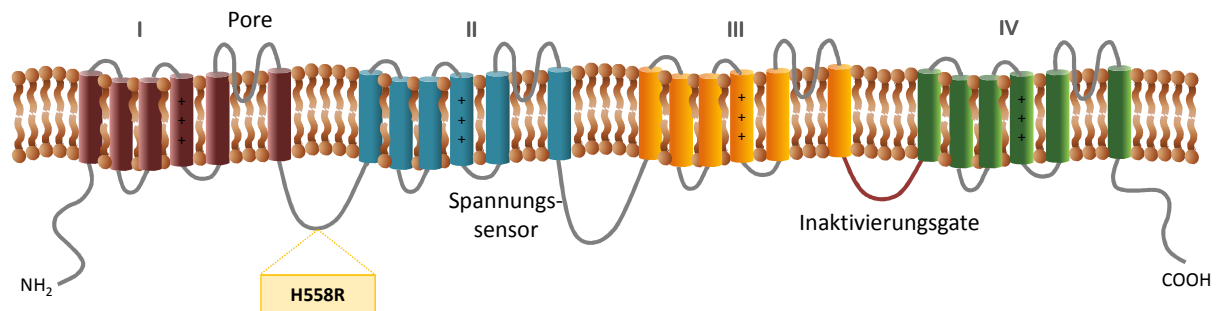


Abbildung 4.1.3-3: Lokalisation des H558R-Polymorphismus im Nav1.5-Natriumkanal.

Der Natriumkanal ist aus vier homologen Domänen DI-DIV aufgebaut. Die Domänen sind über zytoplasmatische Linker verbunden. Der nichtsynonyme H558R-Polymorphismus ist im zytoplasmatischen Linker zwischen der Domäne DI und DII lokalisiert.

4.1.3.2 Genetische Kopplung des H558R- und IVS9-3-C>A-Polymorphismus

Da beide Polymorphismen in den untersuchten Patienten sehr häufig gemeinsam auftraten, wurde die genetische Kopplung zwischen den beiden Polymorphismen untersucht. Die genetische Kopplung zeigt, ob die beiden Polymorphismen unabhängig voneinander untersucht werden können. Dazu wurden 400 Kontrollpersonen des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg-Hessen analysiert. Die Häufigkeit für das gemeinsame Auftreten beider Polymorphismen wurde mit Hilfe der PCR-basierten SSCP-Analyse bestimmt. Anhand der Daten konnten zudem die Allel- und die Genfrequenzen berechnet werden. Die Allelfrequenz bezeichnet die relative Häufigkeit der Kopien eines Allels in einer Population und die Genfrequenz die genetische Vielfalt einer Population. Diese sind in Tabelle 4.1.3-2 aufgeführt.

Tabelle 4.1.3-2: Allel- und Genfrequenzen des H558R- und IVS9-3-C>A-Polymorphismus.

Polymorphismus	Allelfrequenz	homozygote Genfrequenz	heterozygote Genfrequenz
IVS9-3 C>A	0,80 / 0,20	0,04	0,33
H558R A>G	0,77 / 0,23	0,06	0,36

Anhand der Allelfrequenzen wurden unter der Annahme der freien Rekombinierbarkeit die erwarteten Frequenzen der Genotypen berechnet (siehe Tabelle 4.1.3-3). Außerdem wurden die tatsächlichen Frequenzen der Genotypen anhand der Ergebnisse der SSCP-Analyse von den 400 Kontrollen bestimmt. Diese tatsächlichen Frequenzen der verschiedenen Genotypen weichen stark von den erwarteten Frequenzen ab. Die Wahrscheinlichkeit für das gemeinsame Auftreten der R558 mit der IVS9-3 A Variante (Genotyp des Patienten 040) ergab eine berechnete Frequenz von 6 %. Die in der SSCP-Analyse tatsächlich beobachtete Frequenz von 38 % unterscheidet sich sehr stark von der berechneten Frequenz.

Tabelle 4.1.3-3: Bestimmung des Kopplungsungleichgewichtes zwischen dem H558R- und IVS9-3-C>A-Polymorphismus.

Genotyp	tatsächliche Frequenz	erwartete Frequenz	D	D'
IVS9-3 C /H558	0,58	0,56	0,22	0,88
IVS9-3 A /R558	0,38	0,06		
IVS9-3 A /H558	0,01	0,14		
IVS9-3 C /R558	0,03	0,24		

Das Kopplungsungleichgewicht wurde anhand der Formel $D = f(A1A2)f(B1B2) - f(A1B2)f(B1A2)$ bestimmt. D' ergab sich aus der Differenz von D und D_{\max} , $D' = 1$ maximales Kopplungsungleichgewicht.

Aus den tatsächlichen Frequenzen der Genotypen wurde das Kopplungsungleichgewicht oder „linkage disequilibrium“ (LD), wie in Abschnitt 3.11.2 beschrieben, berechnet. Ein Kopplungsungleichgewicht liegt vor, wenn zwei Loci überzufällig häufig gemeinsam auftreten. Um das Kopplungsungleichgewicht weniger allelabhängig auszudrücken, wurde zudem der LD-Koeffizient D' bestimmt. Die beiden Polymorphismen weisen einen sehr hohen LD auf und zeigen ein starkes Kopplungsungleichgewicht. Dieses entspricht einer sehr starken Assoziation, die ebenfalls deutlich wird, da beide Polymorphismen nur 9 % rekombinante Individuen zeigen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die beiden Polymorphismen nicht getrennt voneinander betrachtet werden können. Daher wurde als nächstes die Auswirkung des intronischen IVS9-3-Polymorphismus auf das Spleißing des Natriumkanals untersucht.

4.1.3.3 Auswirkungen des intronischen IVS9-3-C>A-Polymorphismus auf das Spleißing des Natriumkanals

Der Cytosin-zu-Adenosin Nukleotidaustausch an Position IVS9-3 ist in der Akzeptor-Spleißstelle des Introns 9 lokalisiert und könnte das Spleißing des Natriumkanals verändern. Ein Cytosin an der Position -3 ist an der 3`Spleißstelle zu 78 % konserviert (Padgett et al. 1986) und verschiedene Vorhersageprogramme zeigten, dass diese Spleißstelle entfallen könnte (Desmet et al. 2009; Dogan et al. 2007; Brunak et al. 1991).

Um die Auswirkung der Sequenzvariation auf das Spleißing zu untersuchen, wurde das α -Globin-Fibronectin-EBD-Minigen-System von Baralle (Baralle 2003), wie in Abschnitt 3.6.14 beschrieben, verwendet. Das Minigen-System stellt die genomische Struktur der menschlichen DNA nach und enthält sowohl exonische als auch intronische Sequenzen. Durch die Insertion der veränderten Sequenz in dieses System kann das Spleißing untersucht werden.

Der schematische Aufbau des α -Globin-Fibronectin EBD-Minigen-Systems ist in 4.1.5-4 A dargestellt. Dabei sind die Exone als Boxen und die intronischen Bereiche als Linien abgebildet.

Nach der Transfektion und Expression des Minigen-Konstrukts in HEK-293 Zellen wurde die entstandene mRNA isoliert und mittels RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.1.5-4 B dargestellt. Es konnten durch die Prozessierung der WT und IVS9-3-Sequenz zwei unterschiedliche RNA-Spezies identifiziert werden. Die hauptsächliche Bande (747 bp) repräsentiert die normal gespleißte RNA. Die schwächere Bande (239 bp) resultiert aus dem Wegfall des *SCN5A*-Exons 10. Zusätzlich wurden die RT-PCR Ergebnisse mittels Sequenzierung überprüft. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Abbildung 4.1.5-4 C dargestellt. Die obere Sequenz wurde durch das Spleißing der WT-Sequenz und die untere Sequenz durch die Prozessierung der IVS9-3-C>A-Sequenz generiert. Beide Sequenzen beinhalten die normal gespleißte RNA, ebenso ist der Wegfall des Exons 10 des *SCN5A*-Gens sichtbar.

Das Spleißing des Natriumkanals wird nicht durch den Cytosin-zu-Adenin Austausch an Position IVS9-3 verändert. Aufgrund dieser Ergebnisse kann der H558R-Polymorphismus unabhängig vom IVS9-3-Polymorphismus untersucht werden.

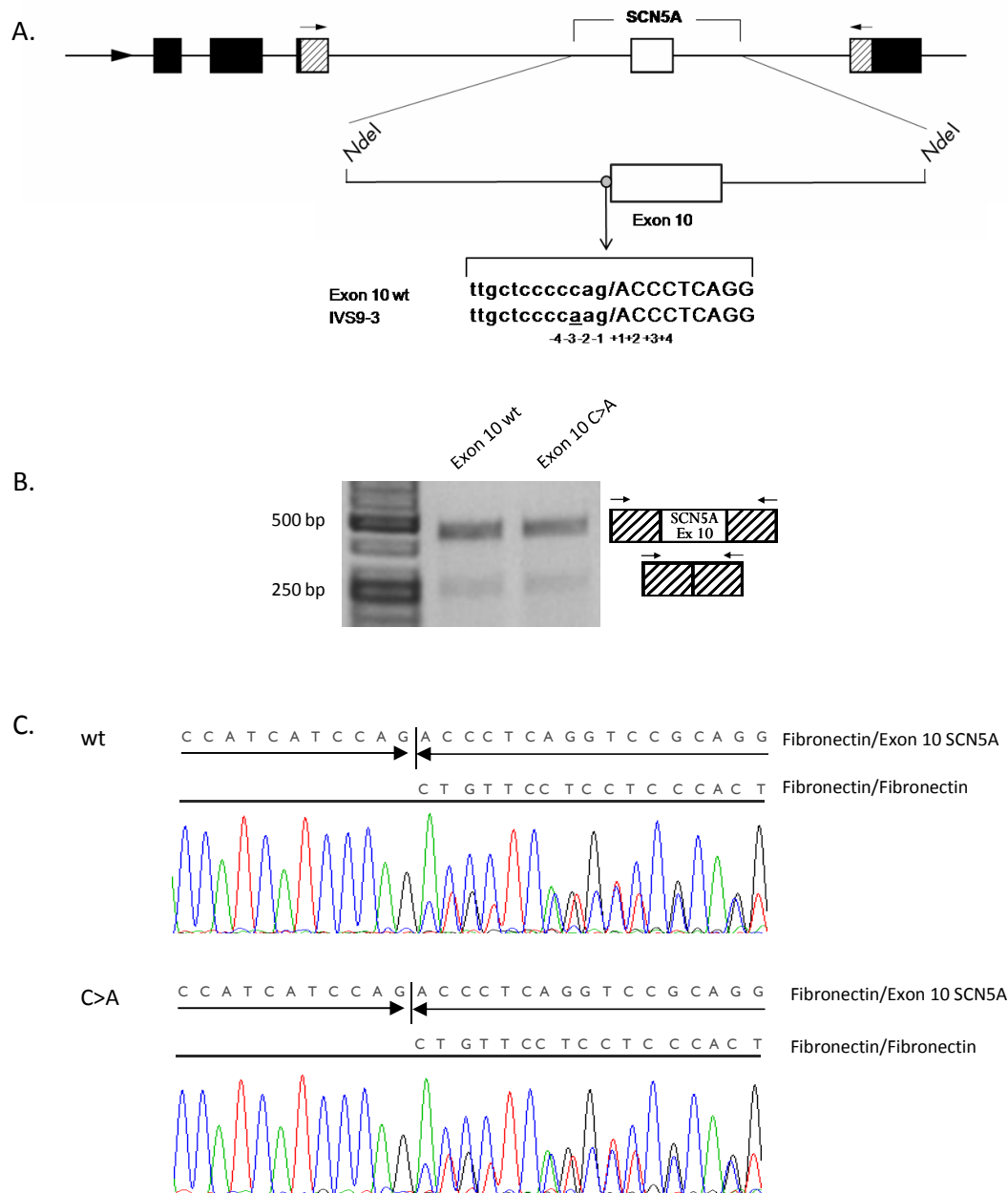


Abbildung 4.1.3-4: Überprüfung des Spleißings des intronischen IVS9-3-C>A-Polymorphismus mittels des EBD- Minigen-Systems.

A Schematische Darstellung des Minigen-Konstrukts, welches das Exon 10 des *SCN5A*-Gens enthält. Das Exon 10 mit intronischen Bereichen auf jeder Seite wurde über die *NdeI*-Schnittstellen in das α -Fibronektin-EBD-Minigen-System kloniert. Exone des α -Fibronektin sind als schwarze und schraffierte Boxen dargestellt. Das Exon 10 des *SCN5A*-Gens ist als weiße Box, die intronischen Bereiche sind als Linien abgebildet. Der Cytosin-zu-Adenin Nukleotidaustausch ist in der unteren Sequenz zu sehen, wobei die Großbuchstaben den Anfang des Exons repräsentieren. Die kleinen Pfeile zeigen die Primer, welche für die Reverse-Transkriptase-PCR benutzt wurden. **B** Agarose-Gelelektrophorese des RT-PCR-Produktes, das durch den Spleißing-Assay generiert wurde. Sowohl die WT als auch die IVS9-3 Sequenz erzeugen zwei verschieden große Banden von 239 bp und 747 bp. Die 239 bp Bande enthält die α -Fibronektin-Exone und die 747 bp Bande die α -Fibronektin-Exone mit dem Exon 10 des *SCN5A*-Gens. **C** Die RT-PCR Ergebnisse wurden mittels Sequenzierung überprüft. Oben ist die Sequenzierung des WT Exons 10 und unten die Sequenzierung des Polymorphismus IVS9-3 dargestellt.

4.1.3.4 Funktionelle Charakterisierung der H558R-Kanalvariante in *Xenopus* Oozyten

Zur funktionellen Charakterisierung von Mutationen in *Xenopus* Oozyten existieren drei verschiedene Natriumkanal Klone (hH1, hH1a, hH1b), die sich hinsichtlich ihrer Sequenz voneinander unterscheiden (vgl. Tabelle 1.5-1). Da bereits in früheren Studien gezeigt wurde, dass der Effekt des H558R-Polymorphismus stark vom Expressionshintergrund abhängt, wurde versucht bei der Auswahl die tatsächliche Sequenz des Patienten zu berücksichtigen. Die Sequenzierung des Exons 18 der genomischen DNA des Patienten 010 zeigte, dass der Patient die seltenere und längere Spleißvariante, die an Position 1077 ein Glutamin aufweist, besitzt. Daher erfolgte die funktionelle Charakterisierung des H558R-Polymorphismus im hH1-Hintergrund, der als einziger ein Q an Position 1077 aufweist.

Es wurden das Strom-Spannungsverhältnis, die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung, die Erholung von der Inaktivierung und die späten Natriumströme analysiert. *Xenopus* Oozyten wurden mit 10 ng WT oder mutierter cRNA injiziert und zwei Tage nach der Injektion Messungen mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt.

Mit Hilfe einer Strom-Spannungskurve ließen sich die elektrophysiologischen Eigenschaften des Kanals darstellen (Abbildung 4.1.5-5). Das Haltepotential betrug -80 mV. Davon ausgehend wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -70 mV und +80 mV in 10 mV Abständen für je 50 ms durchgeführt. In Abbildung 4.1.5-5 rechts sind repräsentative Ströme gezeigt und im linken Teil der Abbildung die Strom-Spannungskurve. Bei depolarisierenden Testpotentialen zeigt der hH1-WT-Kanal eine für Natriumkanäle typische schnelle Aktivierung und Inaktivierung. Der H558R mutierte Kanal resultiert in Strömen, die signifikant größer als die WT-Ströme sind.

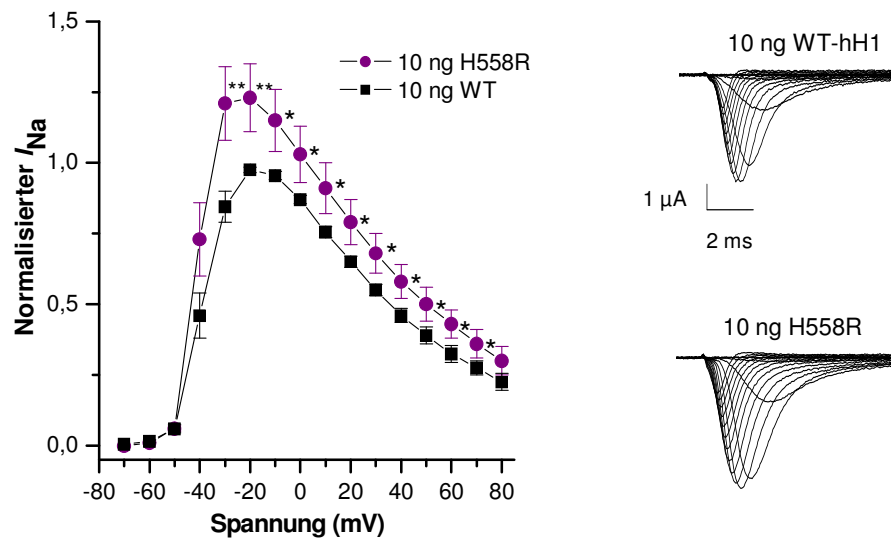


Abbildung 4.1.3-5: Einfluss des H558R-Polymorphismus auf das Strom-Spannungsverhältnis des Nav1.5-Stroms.

Xenopus Oozyten wurden mit 10 ng WT oder 10 ng mutierter Nav1.5 cRNA injiziert und zwei Tage nach der Injektion Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (n=21). Das Haltepotential betrug -80 mV. Davon ausgehend wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -70 mV und +80 mV in 10 mV Abständen für je 50 ms durchgeführt. Links sind die Strom-Spannungskurven und rechts repräsentative Ströme der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines T-Tests ermittelt und ist durch ein oder zwei Sterne gekennzeichnet.

Natriumkanal-Mutationen, die bei Patienten mit LQTS nachgewiesen werden konnten, zeigen meistens eine erhöhte Stromamplitude und oft eine veränderte Inaktivierung (Bennett et al. 1995). Um die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu untersuchen, wurden ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -110 mV und -20 mV in 10 mV Abständen für je 50 ms durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Nachpuls auf +30 mV für 15 ms. Der normalisierte Natriumstrom beim Nachpuls wurde gegen das Vorpuls-Potential in mV aufgetragen (Abbildung 4.1.5-6). Die Inaktivierung folgt einem biexponentiellen zeitlichen Verlauf. Mittels der Software Origin wurden die Zeitkonstanten der biexponentiellen Funktion bei +30 mV ermittelt. Die biophysikalischen Parameter der Inaktivierung sind in Tabelle 4.1.5-3 zusammengefasst. Der H558R mutierte Kanal zeigt keine Veränderungen in der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung.

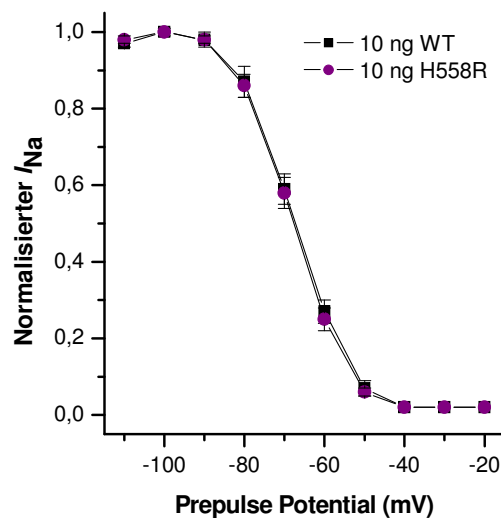


Abbildung 4.1.3-6: Einfluss des H558R-Polymorphismus auf die Spannungsabhängigkeit der Steady-State Inaktivierung des Nav1.5-Stroms.

Xenopus Oozyten wurden mit 10 ng WT oder 10 ng mutierter Nav1.5 cRNA injiziert und zwei Tage nach der Injektion Messungen mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (n=10-11). Das Haltepotential betrug -100 mV. Anschließend wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -110 mV und -20 mV in 10 mV Abständen für je 50 ms durchgeführt. Danach erfolgte ein Sprung zu +30 mV und nach 15 ms wurde wieder auf das Haltepotential von -100 mV zurückgekehrt.

Ein Funktionsgewinn des Natriumkanals kann ebenso auf der Erhöhung des späten Natriumstroms basieren. Zur Analyse des späten Natriumstroms wurde ausgehend von einem Haltepotential von -100 mV ein Spannungssprung zu -30 mV für 50 ms durchgeführt, der resultierende Strom wurde am Ende des durchgeführten Spannungssprungs analysiert. In der Tabelle 4.1.3-5 ist der prozentuale Anteil des späten Natriumstroms am maximalen Strom dargestellt. Die H558R-Kanalvariante zeigt einen mit dem WT-hH1-Kanal vergleichbaren späten Natriumstrom.

Tabelle 4.1.3-4: Analyse der späten Natriumströme der SCN5A-Varianten.

	später Natriumstrom $I_{Na,L}$ in %	n	p
WT-hH1	1,35 ± 0,08	7	nicht signifikant
H558R	1,23 ± 0,08	6	

Zudem erfolgte die Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung (Abbildung 4.1.5-7). Es wurde das gleiche Spannungsprotokoll wie in Abb. 4.1.5-5 verwendet, allerdings nur Ströme zwischen -70 mV und +10 mV ausgewertet. Die Stromamplituden bei jedem Membranpotential wurden durch die berechnete elektrochemische Triebkraft der

Natriumionen geteilt und auf den maximalen Natriumstrom normalisiert. Die Aktivierung folgt einem biexponentiellen zeitlichen Verlauf. Mittels der Software Origin wurden die Zeitkonstanten der biexponentiellen Funktion ermittelt. Der H558R-Kanalvariante zeigt keine Veränderungen in der Spannungsabhängigkeit der Aktivierung.

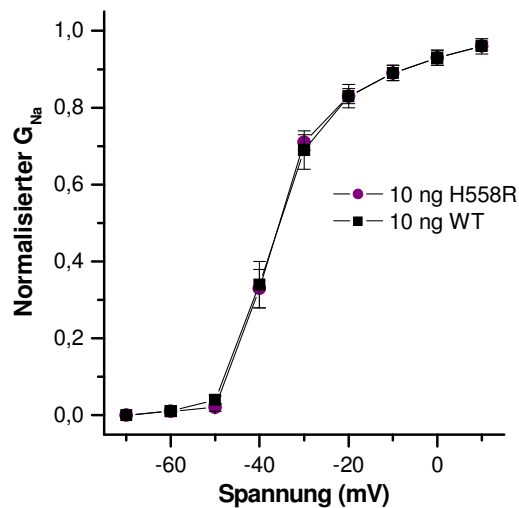


Abbildung 4.1.3-7: Einfluss des H558R-Polymorphismus auf die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung des Nav1.5-Stroms.

Xenopus Oozyten wurden mit 10 ng WT oder 10 ng mutierter Nav1.5 cRNA injiziert und zwei Tage nach der Injektion Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (n=15-20). Das Haltepotential betrug -80 mV. Danach wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -70 mV und +10 mV in 10 mV Abständen für je 50 ms durchgeführt.

Die biophysikalischen Parameter der Aktivierung sind ebenfalls in Tabelle 4.1.5-4 zusammengefasst.

Tabelle 4.1.3-5 Biophysikalische Parameter der Aktivierung und Inaktivierung der SCN5A-Varianten.

	Spannungsabhängigkeit der Aktivierung			Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung (100 ms)		
	V _{1/2} , mV	k, mV	n	V _{1/2} , mV	k, mV	n
WT-hH1	36,3 ± 0,9	6,6 ± 0,8	20	67,0 ± 0,7	6,2 ± 0,5	11
H558R	36,3 ± 1,1	6,1 ± 1,0	15	67,7 ± 0,6	6,3 ± 0,5	10

V_{1/2}, halb maximale Spannung der Inaktivierung; k, Steigungsfaktor

Auch die Erholung von der Inaktivierung des Nav1.5-Natriumkanals kann verändert sein und so zum Langen-QT-Syndrom führen (Albert et al. 2008; Clancy et al. 2003). Um diese zu analysieren wurde ein Zwei-Puls-Spannungsprotokoll angewandt (Abbildung 4.1.5-8). Das Haltepotential betrug -100 mV. Danach erfolgte ein Spannungssprung zu einem Potential von

-10 mV für 50 ms und nach der Zeit $\Delta t = 2$ ein erneuter Spannungssprung zu -10 mV. Die Zeitspanne zwischen den depolarisierenden Potentialsprüngen wurde mit jedem neuen Durchlaufen des Protokolls verlängert, um verschiedene Zeiten für die Erholung von der Inaktivierung zu gewährleisten. Der normalisierte Natriumstrom ist gegen die Zeitspanne zwischen den depolarisierenden Potentialsprüngen exponential in ms aufgetragen. Die H558R-Kanalvariante zeigt eine etwas schnellere Erholung von der Inaktivierung, die allerdings nicht signifikant ist.

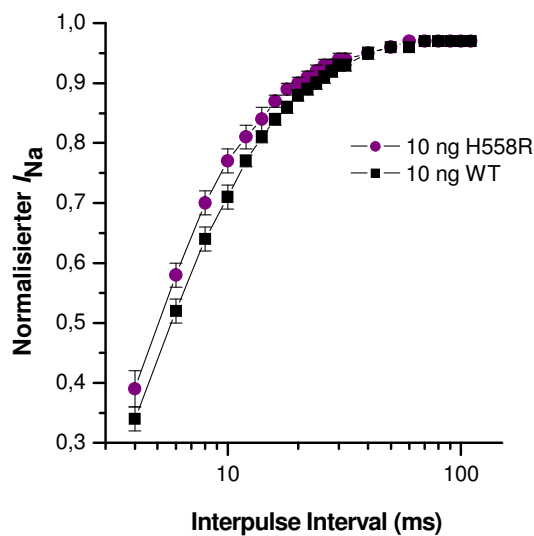


Abbildung 4.1.3-8: Einfluss des H558R-Polymorphismus auf die Erholung von der Inaktivierung des Nav1.5-Stroms.

Xenopus Oozyten wurden mit 10 ng WT oder 10 ng mutierter Nav1.5 cRNA injiziert und zwei Tage nach der Injektion Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (n=27). Die Zeitkonstanten der Erholung von der Inaktivierung wurden mit Hilfe eines Zwei-Puls-Spannungsprotokolls bestimmt. Das Haltepotential betrug -100 mV. Davon ausgehend erfolgte ein Spannungssprung zu einem Potential von -10 mV für 50 ms und nach der Zeit $\Delta t = 2$ ein erneuter Sprung zu -10 mV. Die Zeitspanne zwischen den depolarisierenden Potentialsprüngen wurde mit jedem neuen Durchlaufen des Protokolls verlängert, um verschiedene Zeiten für die Erholung von der Inaktivierung zu gewährleisten.

Die H558R-Kanalvariante zeigt im Vergleich mit dem WT-Kanal eine um 25 % erhöhte Stromamplitude. Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung und der Aktivierung sowie die späten Natriumströme der H558R-Kanalvariante sind unverändert. Eine etwas schnellere Erholung von der Inaktivierung kann beobachtet werden, die allerdings nicht signifikant ist.

4.2 Charakterisierung einer neuen LQT-Form

Der zweite Teil dieser Arbeit umfasst die Charakterisierung einer neuen LQT-Form. Die *KCNJ2*-Mutationen N318S und W322C wurden von Prof. E. Schulze-Bahr in Münster mittels Sequenzierung identifiziert. In einem Kontrollkollektiv von 400 unabhängigen Personen erfolgte der Nachweis, dass es sich um Mutationen und nicht um Polymorphismen handelt. Mutationen im Kir2.1-Kanal konnten bei Patienten mit Andersen-Syndrom nachgewiesen werden. Diese Multisystemerkrankung ist durch einen kardialen Phänotyp, periodische Paralyse und Dysmorphologien charakterisiert. Eine Besonderheit der hier untersuchten Patienten ist, dass diese ausschließlich einen kardialen Phänotyp zeigen. In dieser Arbeit wurden die beiden *KCNJ2*-Mutationen N318S und W322C funktionell charakterisiert und es wurde versucht, den einzigartigen klinischen Phänotyp anhand der elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Ergebnisse zu begründen.

Die Patienten zeigen ausschließlich einen kardialen Phänotyp. Es finden sich keine periodische Paralyse und auch keine Dysmorphologien. Die Patienten haben eine normale Statur. Sie weisen weder Skoliose, Klinodaktylien, Syndaktylie, Brachydaktylie, Hypertelorismus noch Kieferanomalien auf. Außerdem besitzen sie normal geformte Ohren und eine normal ausgeprägte Stirn.

4.2.1 Lokalisation der N318S- und W322C-Mutation im Kir2.1-Kanal

Die Lokalisation der Andersen-Mutationen im Kir2.1-Kanal ist in Abb. 4.2.1-1 gezeigt. Der Kir2.1-Kanal ist aus einer oberen Transmembran-Region und einer unteren cytoplasmatischen Domäne aufgebaut. Links in der Abbildung ist der Kanal von der Seite dargestellt und rechts der C-terminale Bereich des Kanals als Aufsicht aus der Richtung der Plasmamembran. Die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen N318S und W322C sind orange und rot hervorgehoben. Zum Vergleich der Lokalisation sind die bereits beschriebenen C-terminalen Mutationen N216H (dunkelblau), G300V (hellgrün), E303K (blau) und R312C (türkis) ebenfalls abgebildet (Donaldson et al. 2003; Tristani-Firouzi et al. 2002). Zudem ist die auf der „slide“-Helix liegende Mutation Y68D (hellblau) gezeigt (Decher et al. 2007). Die beiden Mutationen Y68D und N216H dienen bei später beschriebenen Experimenten als Kontrollen. Die C-terminalen Mutationen N216H, G300V, E303K und R312C sind im oberen Bereich der cytoplasmatischen Domäne lokalisiert und

weisen zur Plasmamembran. Dahingegen sind die Mutationen N318S und W322C seitlich der cytoplasmatischen Region lokalisiert. Die hier analysierten Mutationen grenzen sich damit deutlich von allen bisher beschriebenen C-terminalen Mutationen ab.

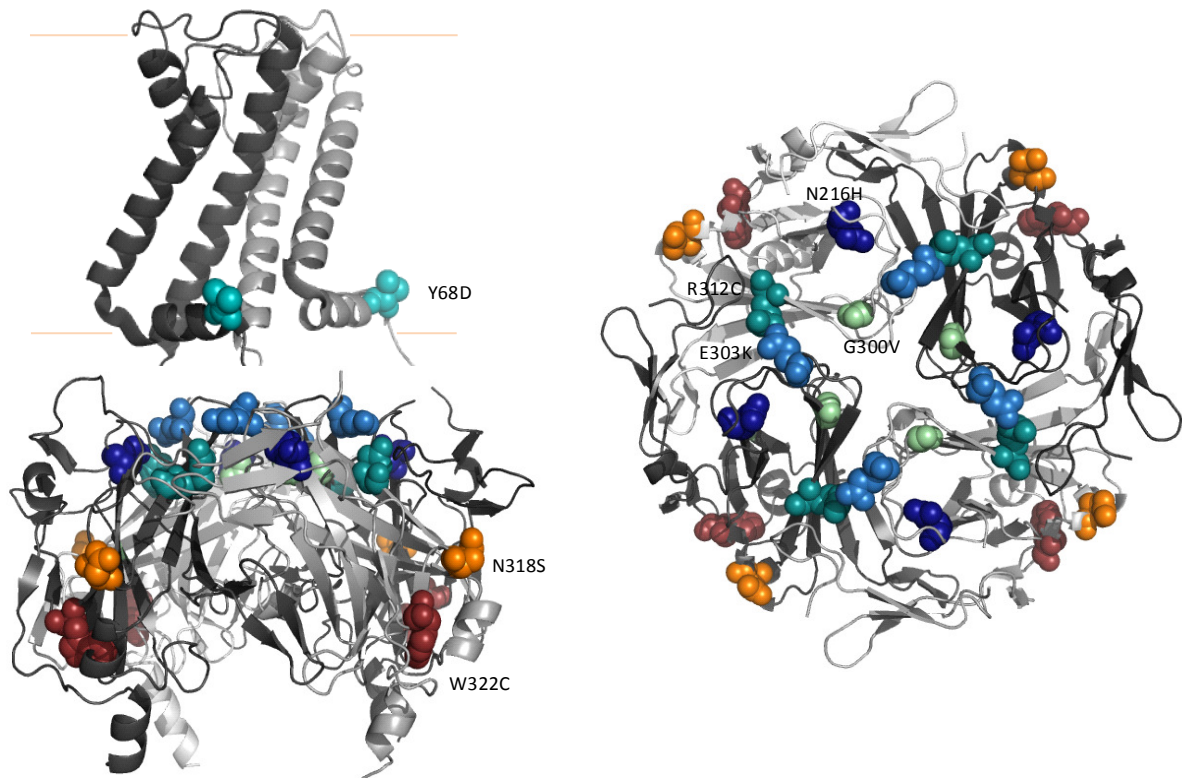


Abbildung 4.2.1-1: Lokalisation der Andersen-Mutationen im Kir2.1-Homologie-Modell.

Links in der Abbildung ist der Kir2.1-Kanal von der Seite dargestellt. Dabei zeigt der untere Teil vier Untereinheiten des C-terminalen Bereichs des Kir2.1-Kanals (Pegan et al. 2005). Der obere Bereich basiert auf zwei Untereinheiten des KirBac1.1-Kristalls (Kuo et al. 2003) mit der inneren und äußeren Helix und der Porenregion. Die Position der Plasmamembran ist durch beige Linien repräsentiert. Die W322C- ist rot und die N318S-Mutation orange dargestellt. Zum Vergleich der Lokalisation sind die bereits früher beschriebenen Mutationen Y68D (hellblau), N216H (dunkelblau), G300V (hellgrün), E303K (blau) und R312C (türkis) ebenfalls abgebildet. Links in der Abbildung ist eine Aufsicht von der Seite der Plasmamembran auf die C-terminale Region des Kir2.1-Kanals gezeigt. Die Mutationen N318S und W322C zeichnen sich durch ihre einzigartige Lokalisation innerhalb des Kanals aus.

4.2.2 Konservierung der N318S- und W322C-Mutation innerhalb der Kir-Familie

Es sind 15 verschiedene Kir-Kanäle beschrieben, die in sieben Unterfamilien eingeteilt werden können. In Abbildung 4.2.2-1 ist der Vergleich der *KCNJ2*-Primärsequenz mit den anderen Mitgliedern der Kir-Familie gezeigt. Die Position der N318S-Mutation ist orange und die der W322C-Mutation rot hervorgehoben. Der Aminosäurerest Tryptophan an der

Position 322 ist innerhalb der Kir-Familie hoch konserviert. Nur im Kir7.1-Kanal befindet sich an dieser Position ein Leucin anstelle des Tryptophans. Dahingegen zeigt der Aminosäurerest Asparagin an der Position 318 keine Konservierung innerhalb der Kir-Familie.

	318	322
Kir4.1-KCNJ10	FELVLILSGTVESTSATCQVRTSYLP	EEILWGYEFTPAISL
Kir4.2-KCNJ15	FELVLLNATVESTSAVCQSRTSYIPE	EIIYWGFEFVPVSL
Kir1.1-KCNJ1	FELVFLDGTVESTSATCQVRTSYVPE	EVLWGYRFAPIVSK
Kir2.1-KCNJ2	FEIVVILEGMVEATAMTTQCRSSYLANE	ILWGHRYEPVLFE
Kir2.2-KCNJ12	FEIVVILEGMVEATAMTTQARSSYLANE	ILWGHRFEPVLFE
Kir2.3-KCNJ4	FEIVVILEGMVEATAMTTQARSSYLA	SEILWGHRFEPVFE
Kir2.4-KCNJ14	FELVILEGMVEATAMTTQCRSSYLP	GELLWGHRFEPVLFQ
Kir5.1-KCNJ16	FEILVTFIYTG DSTGTSHQSRSSYVP	REILWGHRFNDVLEV
kir6.1-KCNJ8	LEVIVILEGVVETTGITTQARTSYIA	EIQWGHRFVSIVTE
kir6.2-KCNJ11	LEIIVILEGVVETTGITTQARTSYLA	DEILWQRFVPIVAE
Kir3.2-KCNJ6	LEIVVILEGMVEATGMTQCARSSYIT	SEILWGYRFTPVLTL
Kir3.4-KCNJ5	FEVVILEGMVEATGMTQCARSSYMD	TEVLWGHRFFTPVLTL
Kir3.3-KCNJ9	FEIVVILEGMVEATGMTQCARSSYLV	DEVLWGHRFVSVLTL
Kir3.1-KCNJ3	FEIVVILEGIVETTGMTQCARTSYTE	DEVLWGHRRFFPVISL
Kir7.1-KCNJ13	FELVFLSAMQEGTGEICQRRTSYLP	SEIMLHHCFAALLTR

Abbildung 4.2.2-1: Sequenzvergleich der *KCNJ2*-Primärsequenz mit den anderen Mitgliedern der Kir-Familie.

Gezeigt ist ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs der verschiedenen Kir-Kanäle. Der Aminosäurerest N318 ist orange und W322 rot hinterlegt. Das Tryptophan an der Position 322 ist innerhalb der Kir-Familie hoch konserviert. Dahingegen ist das Asparagin an Position 318 nicht konserviert. Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programm ClustalW (European Bioinformatics Institute) erstellt.

4.2.3 Funktionelle Charakterisierung der N318S- und W322C-Kanalvariante in *Xenopus* Oozyten

Das Andersen-Syndrom ist eine autosomal dominante Krankheit. Alle bisher beschriebene Andersen-Mutationen zeigen einen absoluten Funktionsverlust und weisen einen dominant negativen Effekt auf WT-Untereinheiten auf.

Um zu überprüfen, ob die N318S- und W322C-Mutation diesen funktionellen Eigenschaften entsprechen, wurden Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (vgl. 2.8.2). Hierzu wurden *Xenopus* Oozyten mit 2,5 ng mutierter oder Kir2.1-WT cRNA injiziert (Abbildung 4.2.3-1). Als Kontrolle dienten die zwei dominant negativen Mutationen Y68D und N216H (Tristani-Firouzi et al. 2002; Decher et al. 2007). Da die Mutationen bei den Patienten heterozygot vorliegen, wurde der mutierte Kanal zudem zusammen mit dem WT-Kanal koinjiziert (1,25 ng WT + 1,25 ng mutierter Kanal). Die Messung der Ströme erfolgte 48 h nach der Injektion. Mithilfe einer Strom-Spannungskurve ließen sich die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle darstellen (Abbildung 4.2.3-

1). Das Haltepotential betrug -80 mV. Davon ausgehend wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -140 mV und 30 mV in 10 mV Abständen für je 200 ms durchgeführt.

Der obere Teil der Abbildung 4.2.3-1 A zeigt repräsentative Ströme der Kir2.1-Kanalvarianten und der untere Teil repräsentative Ströme der mit Kir2.1-WT koexprimierten Kanäle. Die Kir2.1-Kanäle weisen eine sofortige Aktivierung und eine starke Einwärtsrektifizierung auf. Zum Vergleich der elektrophysiologischen Eigenschaften sind in Abbildung 4.2.3-1 B die Strom-Spannungskurven der dominant negativen *KCNJ2*-Mutationen Y68D (hellblau) und N216H (dunkelblau) dargestellt. Die Injektion von 2,5 ng WT cRNA resultiert in Strömen, die doppelt so groß sind wie die Ströme, die durch die Injektion von 1,25 ng WT cRNA beobachtet werden. Y68D und N216H allein zeigen bei allen Spannungen keine Ströme und einen dominant negativen Effekt.

In Abbildung 4.2.3-1 C sind die Strom-Spannungskurven der N318S- und W322C-Kanalvarianten dargestellt. Der N318S mutierte Kanal alleine (orange) zeigt einen Strom, der nicht vom WT-Strom zu unterscheiden ist. Aus dem W322C mutierte Kanal alleine (rot) resultiert ein Strom, der gegenüber dem WT-Strom um 60 % reduziert ist. Koinjiziert mit der WT cRNA zeigen beide Kanalvarianten Ströme, die im Vergleich mit den WT-Strömen um nur 20-25 % reduziert sind. Beide Kanalvarianten haben somit keinen dominant negativen Effekt auf den WT-Kanal.

Der Vergleich der N318S- und W322C-Mutation mit den bereits beschriebenen Andersen-Mutationen zeigt die außergewöhnlichen elektrophysiologischen Eigenschaften der hier charakterisierten Kanalvarianten. Sie bewirken keinen absoluten Funktionsverlust und haben auch keinen dominant negativen Effekt.

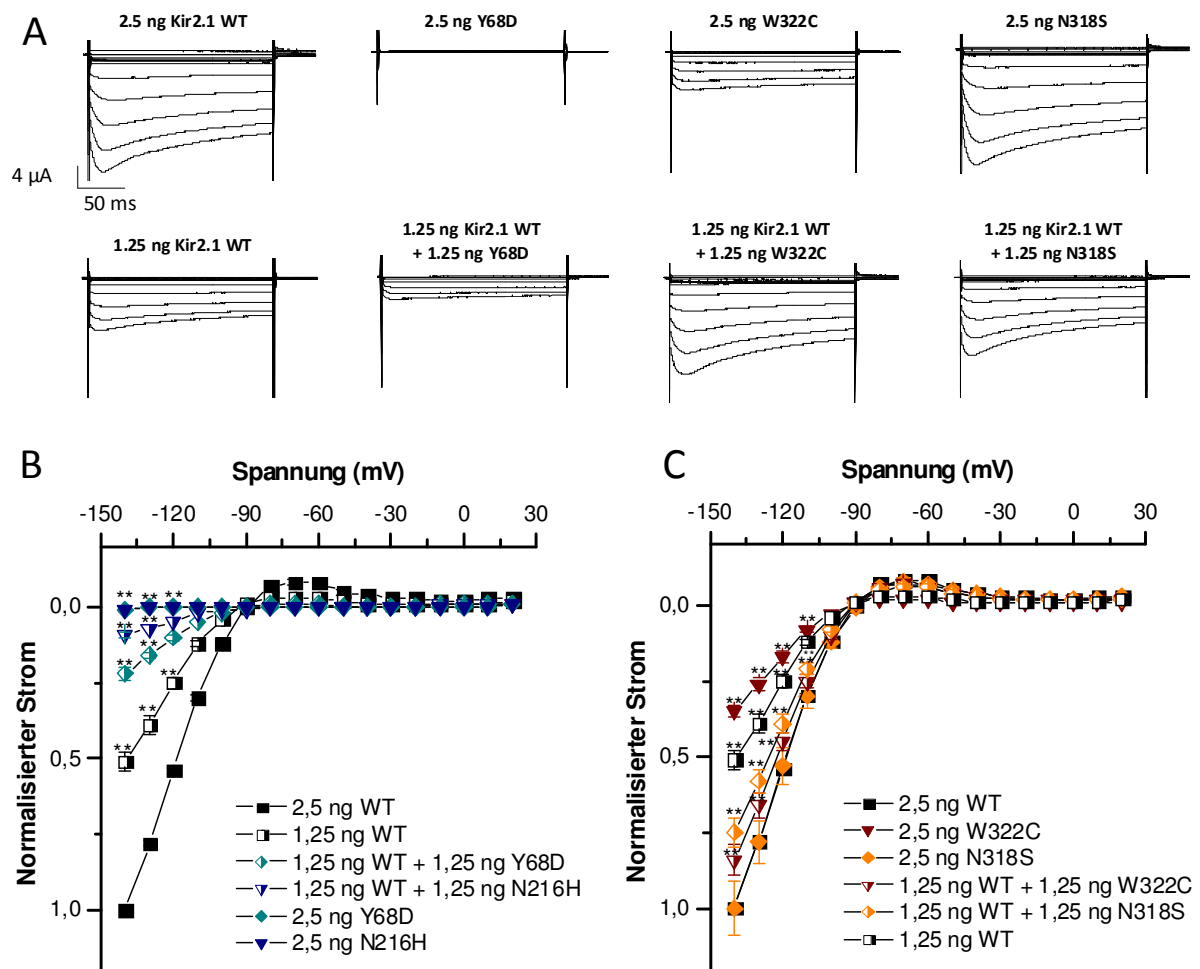


Abbildung 4.2.3-1: Einfluss der mutierten Kir2.1-Kanäle auf das Strom-Spannungsverhältnis.

Xenopus Oozyten wurden mit 2,5 ng WT oder 2,5 ng mutierter Kir2.1 cRNA injiziert und zwei Tage nach der Injektion Messungen mittels der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme durchgeführt (n=22). Um zu überprüfen, ob die mutierten Kir2.1-Kanäle einen dominant negativen Effekt ausüben, wurden 1,25 ng WT cRNA allein oder 1,25 ng WT cRNA mit 1,25 ng mutierter cRNA koinjiziert (n=22). Zum Vergleich dienten die dominant negativen Mutationen Y68D und N216H. Das Haltepotential betrug -80 mV. Danach wurden Spannungssprünge zu Potentialen zwischen -40 mV und +30 mV in 10 mV Abständen für je 200 ms durchgeführt. In **A** sind repräsentative Ströme der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme dargestellt. **B** zeigt die Stromspannungskurven der dominant negativen Mutationen Y68D (hellblau) und N216H (dunkelblau). In **C** sind die Stromspannungskurven der Mutationen N318S (orange) und W322C (rot) abgebildet. Die Kanalvarianten N318S und W322C zeigen beide keinen kompletten Funktionsverlust und auch keinen dominant negativen Effekt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe eines T-Tests ermittelt und ist durch Sterne gekennzeichnet.

4.2.4 Einfluss der N318S- und W322C-Kanalvariante auf die Kir2.2- und Kir2.3-Kanäle

Kir2.1-Kanäle können funktionelle Heteromere mit Kir2.2-, Kir2.3- und Kir2.4-Kanälen bilden. Im Herzen konnte eine Expression nur für Kir2.2- und Kir2.3-Kanäle nachgewiesen werden. Alle bisher beschriebenen Mutationen zeigen nicht nur einen dominant negativen Effekt auf Kir2.1-Untereinheiten, sondern weisen auch unterschiedlich starke dominant

negative Effekte auf Kir2.2 und Kir2.3 auf. Obwohl die N318S- und die W322C-Kanalvariante keinen dominant negativen Effekt auf die Kir2.1-Kanäle zeigen, wäre es denkbar, dass sie auf den Kir2.2- und Kir2.3-Kanal einen dominant negativen Effekt haben. Um dieses zu untersuchen, wurden Messungen mit Hilfe der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme an *Xenopus* Oozyten durchgeführt (Abb. 4.2.4-1). Zum Vergleich wurde die Y68D-Kanalvariante, die einen dominant negativen Effekt auf Kir2.2 und Kir2.3 hat, ebenfalls analysiert.

Hierzu wurden die *Xenopus* Oozyten mit Kir2.1-WT oder mutierter cRNA zusammen mit Kir2.2-WT cRNA (1,25 ng + 1,25 ng) koinjiziert (Abb. 4.2.4-1 A). Zwei Tage nach der Injektion wurden die Oozyten bei einem Potential von -80 mV gehalten ein hyperpolarisierender Sprung zu -120 mV für 1 s durchgeführt. Die Auswertung der Stromgröße erfolgte am Ende des -120 mV Pulses. Die Y68D-Kanalvariante hat einen dominant negativen Effekt auf den Kir2.2-Strom. Werden der Kir2.1-WT-Kanal oder die mutierten Kanäle (N318S und W322C) zusammen mit dem Kir2.2-Kanal in gleichen Mengen koexprimiert, resultiert dies in Strömen, die 20-30 mal so groß sind wie die Kir2.2-Ströme. Die gleichen Ergebnisse können bei der Koexpression mit Kir2.3 beobachtet werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die N318S- und die W322C-Kanalvariante haben keinen dominant negativen Effekt auf Kir2.2- und Kir2.3-Kanäle.

Da die Kir2.1/Kir2.x Heteromere sehr große Ströme erzeugen und der Anteil der Kir2.x Untereinheiten am gesamten Strom weniger als 5 % ausmachen, wurden im folgenden Experiment cRNA-Konzentrationen injiziert, die in gleichen Stromamplituden resultieren. Vergleichbare Ströme werden durch die Injektion von 7.5 ng Kir2.2 oder Kir2.3 cRNA mit 1 ng Kir2.1 cRNA erzeugt. In Abbildung 4.2.4-1 B ist der Einfluss der Andersen-Kanalvarianten auf den Kir2.2-Kanal und in C auf den Kir2.3-Kanal gezeigt. Die Oozyten wurden wieder bei einem Potential von -80 mV gehalten und dann ein hyperpolarisierender Sprung zu -120 mV für 1 s durchgeführt. Der Y68D-Kanal hat auch in diesem Versuch einen dominant negativen Effekt auf die Kir2.2- und Kir2.3-Kanäle. Dahingegen kann bei der N318S- und W322C-Kanalvariante kein dominant negativer Effekt beobachtet werden.

Auch unter diesen Versuchsbedingungen haben die neuen Kanalvarianten keinen dominant negativen Effekt auf die beiden Kanäle der Kir-Familie Kir2.2 und Kir2.3 auf.

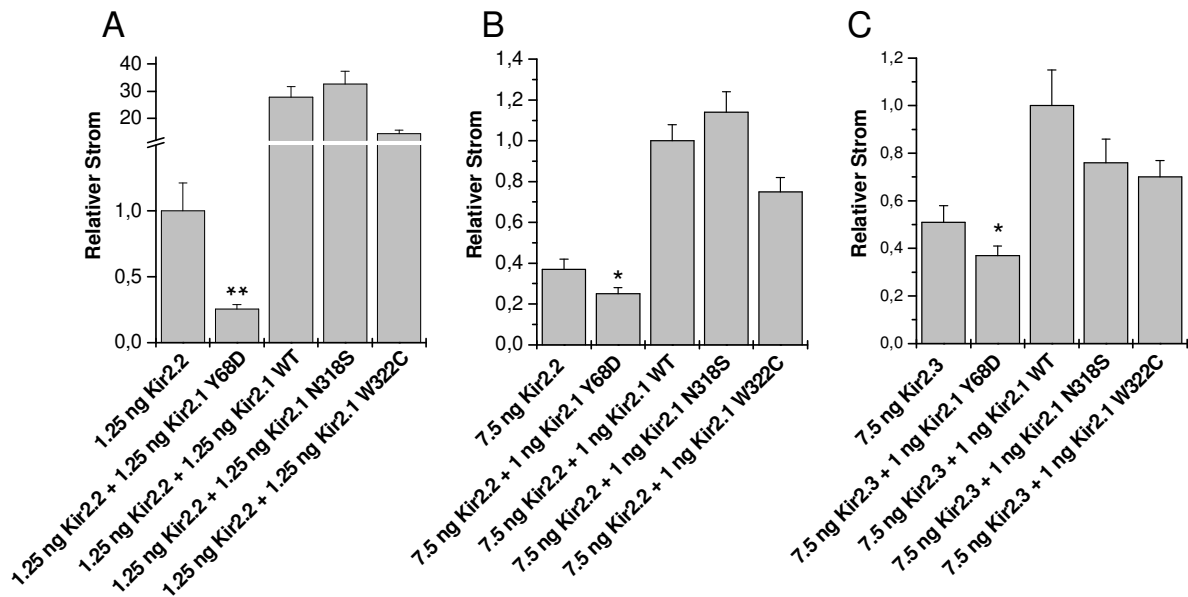


Abbildung 4.2.4-1: Einfluss der Kir2.1 mutierten Kanäle auf die relativen Stromamplituden der Kir2.2- und Kir2.3-Kanäle.

Um zu überprüfen, ob die mutierten Kir2.1-Kanäle einen dominant negativen Effekt auf Kir2.2- und Kir2.3-Kanäle ausüben, wurden Oozyten mit verschiedenen cRNA-Konzentrationen injiziert. Zwei Tage nach der Injektion wurden die Oozyten bei einem Potential von -80 mV gehalten und dann ein hyperpolarisierender Sprung zu -120 mV für 1 s durchgeführt. Das Ablesen der Stromgröße erfolgte jeweils am Ende des depolarisierenden Pulses. **A** Oozyten wurden mit 1,25 ng Kir2.2 cRNA allein oder zusammen mit 1,25 ng Kir2.1-WT oder mutierter Kir2.1 cRNA injiziert (n=12). Die dominant negative Y68D-Mutation wurde zum Vergleich mit untersucht. **B-C** Oozyten wurden mit 7,5 ng Kir2.2/Kir2.3 cRNA und 1 ng WT oder mutierten Kir2.1-Kanälen koexprimiert (n=24).

4.2.5 Oberflächenexpression des N318S- und W322C-Kanals in *Xenopus* Oozyten

Der Funktionsverlust der Kir2.1-Kanäle kann neben einem veränderten Öffnungsverhalten oder einer verminderten Affinität für PIP_2 durch einen gestörten Transport an die Plasmamembran hervorgerufen werden. Die Quantifizierung der Oberflächenexpression der Andersen-Kanalvarianten in *Xenopus* Oozyten erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Versuches (Zerangue et al. 1999), wie in Abschnitt 3.6.18 beschrieben. Alle Konstrukte weisen ein HA-Epitop auf. 2,5 ng WT oder mutierte Kir2.1 cRNA wurde in Oozyten injiziert und die Expression 48 h nach der Injektion luminometrisch ermittelt. Die Ergebnisse sind in relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben und wurden auf die WT-Werte normiert (Abb 4.2.5-1). Die RLU-Werte spiegeln die Oberflächenexpression der Kanäle wieder. Als Negativkontrolle dienten mit Wasser injizierte Oozyten. Der N318S-Kanal zeigt keine Veränderung in der Oberflächenexpression. Die RLU-Werte entsprechen den für den WT-Kanal gemessenen Werten. Anders verhält sich die W322C-Kanalvariante. Sie zeigt im

Chemilumineszenz-Versuch signifikant geringere RLU-Werte als der Kir2.1-WT-Kanal. Die gemessenen RLUs sind mit den RLUs der mit Wasser injizierten Oozyten vergleichbar. Die Oberflächenexpression in *Xenopus* Oozyten ist somit bei dem W322C-Kanal eindeutig gestört.

Der Funktionsverlust des W322C-Kanals könnte durch einen gestörten Transport an die Plasmamembran hervorgerufen werden.

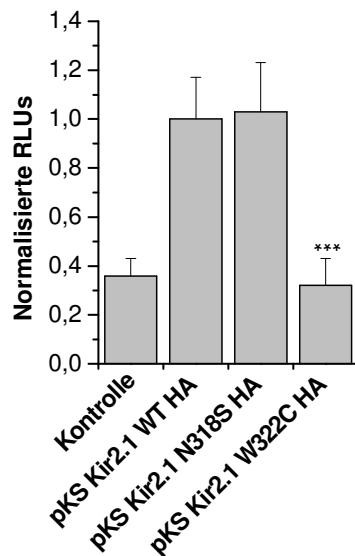


Abbildung 4.2.5-1: Oberflächenexpression der mutierten Kir2.1-Kanäle in *Xenopus* Oozyten.

Um die Oberflächenexpression zu quantifizieren, wurden Kir2.1-Konstrukte mit einem extrazellulären HA-Epitop verwendet und die Expression mit einem Chemilumineszenz-Versuch bestimmt. Hierzu wurde 2,5 ng WT oder mutierte Kir2.1 cRNA in Oozyten injiziert und die Expression 48 h nach der Injektion luminometrisch ermittelt. Es sind die Mittelwerte der RLUs von 60 Oozyten an drei unabhängigen Tagen dargestellt. Als Negativkontrolle dienten mit Wasser injizierte Oozyten.

4.2.6 Transport der Kir2.1-Kanäle an die Zellmembran

Wie bereits erwähnt können Kanäle mit Mutationen einen defizienten Transport an die Zellmembran in Säugerzellen aufweisen, auch wenn sie in *Xenopus* Oozyten eine unveränderte Oberflächenexpression zeigen. Daher wurde der Transport zur Zellmembran für beide Kanalvarianten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie, wie in 3.10.1 beschrieben, untersucht. Alle Versuche wurden in Cos-7 Zellen durchgeführt, da bei diesen Zellen die unterschiedlichen Kompartimente gut zu unterscheiden sind.

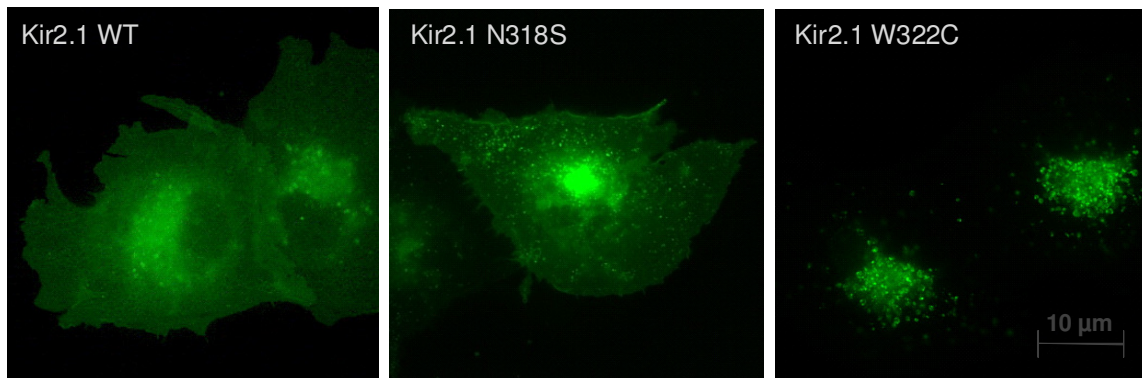


Abbildung 4.2.6-1: Zelluläre Lokalisation der mutierten Kir2.1-Kanäle in Cos-7 Zellen.

Cos-7 Zellen wurden mit 1 µg pEGFP-Kir2.1-WT, -N318S oder -W322C Konstrukten transformiert und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit einem Kohlendioxidgehalt von 5 % bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Nach 16 h wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation der WT und der mutierten Kir-Kanäle verglichen. Der Kir2.1-WT- und der Kir2.1-N318S-Kanal zeigen eine Fluoreszenz an der Plasmamembran. Anders verhält sich der W322C mutierte Kanal. Hier ist eine perinukleäre Verteilung des Kanals in zytoplasmatischen Vesikeln sichtbar. Die Bilder wurden in einer 63 x Vergrößerung aufgenommen.

Cos-7 Zellen wurden mit 1 µg pEGFP-Kir2.1-WT, pEGFP-Kir2.1-N318S oder pEGFP-Kir2.1-W322C, wie in Abschnitt 3.9.3 beschrieben, transfiziert und bei 37 °C kultiviert. Nach 8 h, 16 h, 24 h und 36 h wurde der Transport von Kir2.1-WT, -N318S und -W322C an die Zellmembran und die Oberflächenexpression mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt. Nach 16 h zeigen die Kir-Kanäle eine deutliche Fluoreszenz an der Plasmamembran. In Abbildung 4.2.6-1 ist die zelluläre Lokalisation der mutierten Kir2.1-Kanäle in Cos-7 Zellen dargestellt. Der Kir2.1-WT-Kanal (links) und der Kir2.1-N318S-Kanal (Mitte) zeigen eine Fluoreszenz an der Plasmamembran. Der W322C mutierte Kanal ist im Zytoplasma, jedoch nicht in der Plasmamembran lokalisiert. Er zeigt eine intrazelluläre vesikuläre Verteilung. Auch 24 h und 36 h nach der Transfektion konnte keine Fluoreszenz an der Plasmamembran beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Weiter wurde die Kolo-kalisation der mutierten Kir-Kanäle mit dem Kir2.1-WT in Cos-7 Zellen 16 h nach der Transfektion untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.2.6-2 dargestellt. Cos-7 Zellen wurden mit 0,5 µg pDsRed-Kir2.1-WT und 0,5 µg pEGFP-Kir2.1 (WT, N318S und W322C) Konstrukten transformiert und bei einer Temperatur von 37 °C kultiviert. Das EGFP-Signal ist in grün (links) und DsRed in magentarot (Mitte) dargestellt. Eine Kolo-kalisation ist in weiß sichtbar (rechts). Der Kir2.1-WT-Kanal (obere Reihe) und der N318S-Kanal (mittlere Reihe) in grün zeigen zusammen mit dem Kir2.1-WT-Kanal (DsRed) eine deutliche Kolo-kalisation an der Plasmamembran. Der W322C mutierte Kanal ist intrazellulär verteilt. Eine Kolo-kalisation mit dem Kir2.1-WT-Kanal (DsRed) an der

Plasmamembran kann nicht gezeigt werden. Nur eine Kolokalisation in cytoplasmatischen Vesikeln ist nachweisbar.

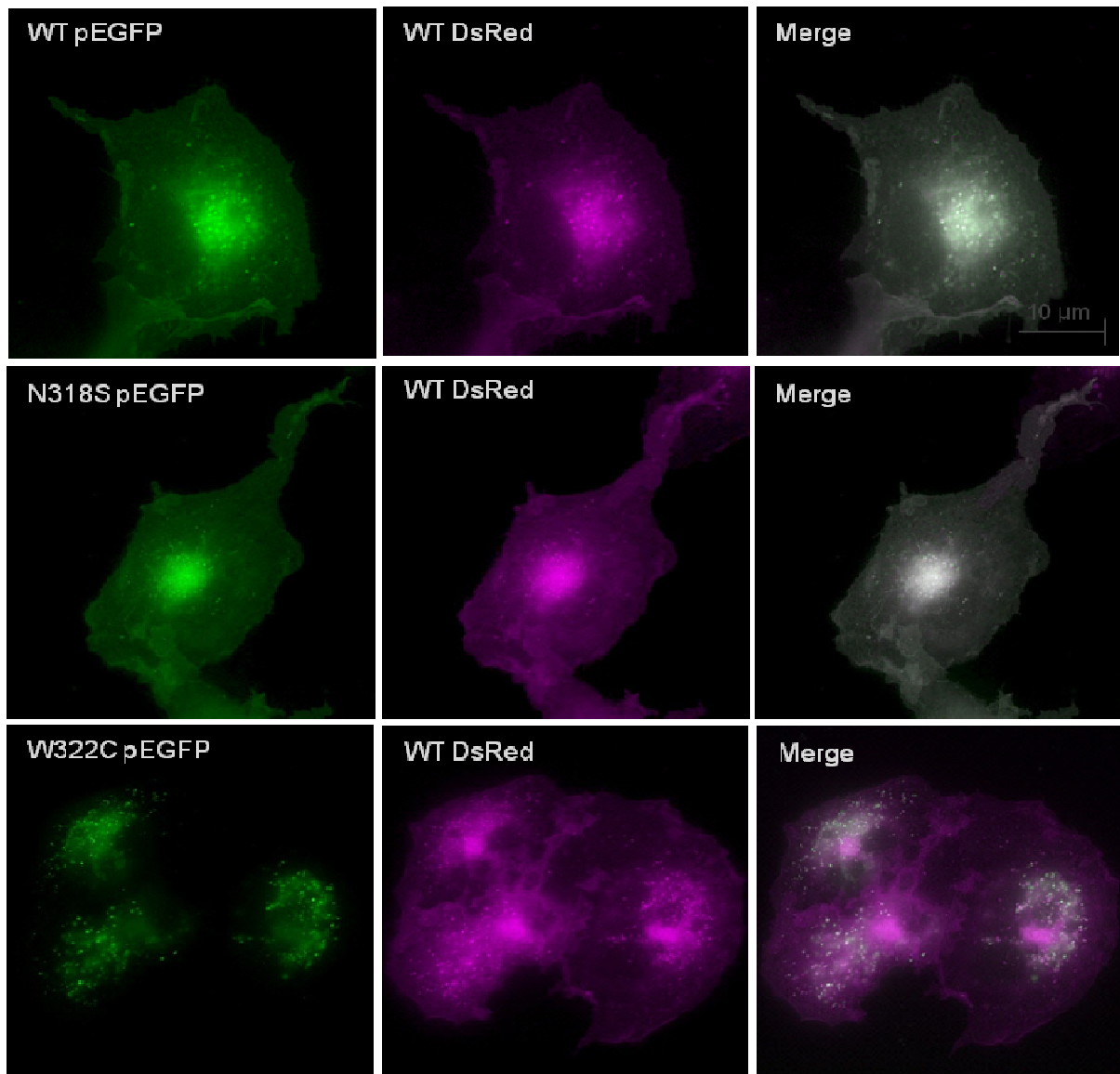


Abbildung 4.2.6-2: Kolokalisation der Kir2.1-WT und mutierten Andersen-Kanäle in Cos-7 Zellen.

Cos-7 Zellen wurden mit 0,5 µg pDsRed-Kir2.1-WT und 0,5 µg pEGFP-Kir2.1 (WT, N318S und W322C) Konstrukten transformiert. 16 h nach der Transfektion wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie die Kolokalisation der WT-Kanäle mit den mutierten Kir-Kanälen analysiert. Das EGFP-Signal ist in grün (links) und DsRed in magentarot (Mitte) dargestellt. Eine Kolokalisation ist in weiß sichtbar (rechts). Der Kir2.1-WT-Kanal und der N318S-Kanal in grün zeigen eine deutliche Kolokalisation mit dem Kir2.1-WT-Kanal (DsRed) an der Plasmamembran. Der W322C mutierte Kanal kann nur im Cytoplasma lokalisiert werden. Eine Kolokalisation mit dem Kir2.1-WT-Kanal (DsRed) an der Plasmamembran kann nicht beobachtet werden. Es ist nur eine Kolokalisation in cytoplasmatischen Vesikeln nachweisbar. Die Bilder wurden in einer 63 x Vergrößerung aufgenommen. Zur Auswertung wurde die Software Image-Pro® Plus 4.5 (Mediacybernetics) genutzt.

4.2.7 Sublokalisierung der W322C-Kanalvariante in Cos-7 Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass der W322C mutierte Kanal einen defizienten Transport an die Plasmamembran aufweist und intrazellulär lokalisiert ist. Um die Sublokalisierung der W322C-Kanalvariante im Vergleich zu dem Wildtyp-Kanal und der N318S-Kanalvariante zu untersuchen, wurden die Kanäle immunozytochemisch und fluoreszenzmikroskopisch an drei verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion 8 h, 16 h und 24 h analysiert (Abb. 4.2.7-1, 4.2.7-2).

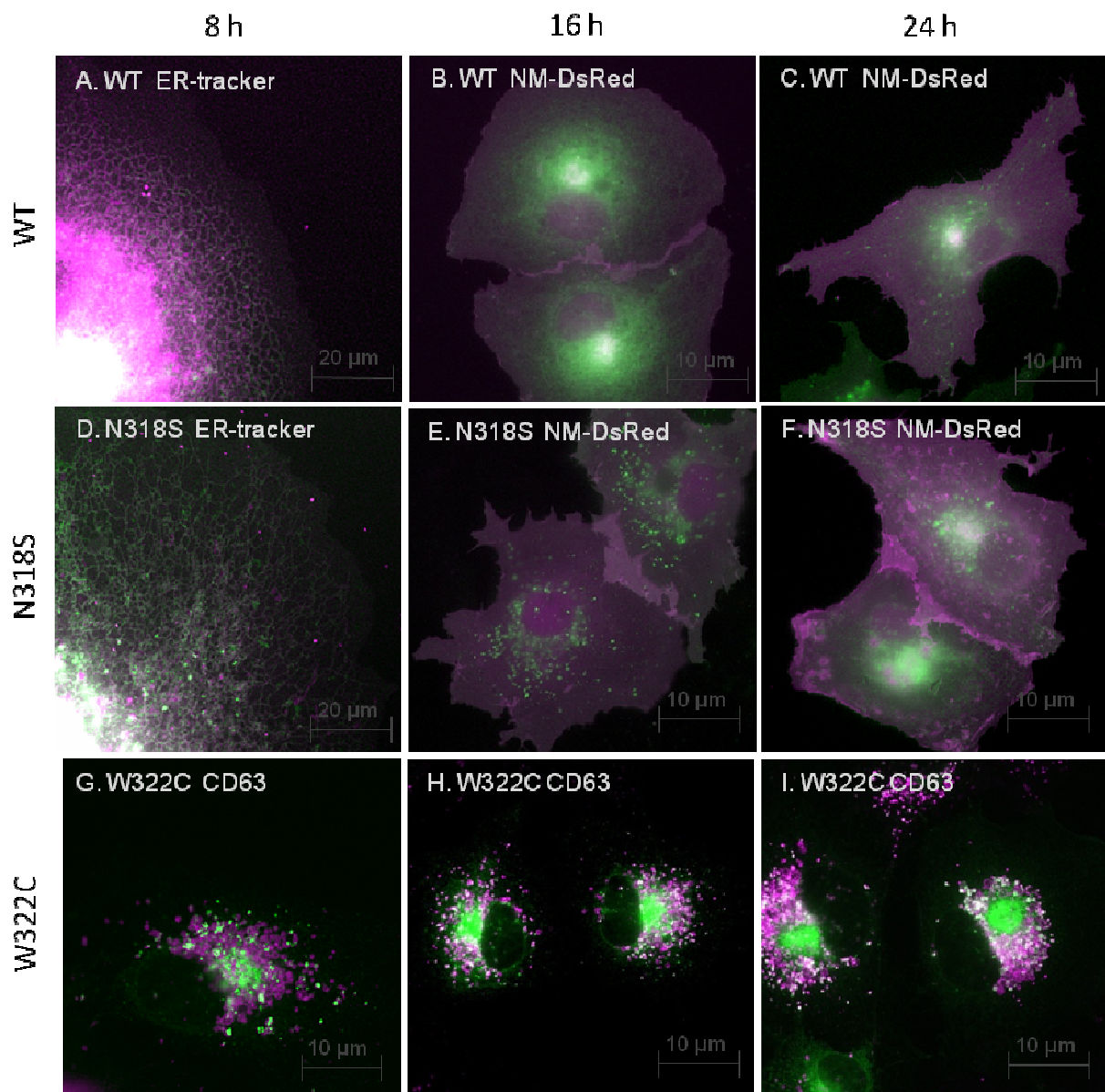


Abbildung 4.2.7-1: Sublokalisierung der Kir2.1-WT und mutierten Kanäle in Cos-7 Zellen.

(A, D) Cos-7 Zellen wurden mit 1 µg pEGFP-Kir2.1 (WT und N318S) Konstrukten transfiziert und nach 8 h mit ER-Tracker (rot) gefärbt. In B, C, E und F wurden die Zellen mit einem Marker der Plasmamembran (NM-DsRed) kotransfiziert und nach 16 h und 24 h mittels Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisation an der Plasmamembran analysiert. (G, H, I) 8 h, 16 h und 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Methanol fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen späte Endosomen (CD63) gefärbt. Der W322C mutierte Kanal zeigt eine deutliche Lokalisation in den späten Endosomen, wohingegen der WT-Kanal und der N318S mutierte Kanal an die Plasmamembran transportiert werden.

Cos-7 Zellen wurden mit Kir2.1-WT oder mutierten Kanälen mit einem Plasmamembranmarker kotransfiziert oder nachträglich mit einem ER-Marker (ER-Tracker™ Blue-White DPX, Molecular Probes) in einer Konzentration von 1 μ M für 30 min bei 37 °C gefärbt. NM-DsRed enthält die Signalsequenz des Membranproteins Neuromodulin und wurde als Plasmamembranmarker verwendet (Zuzarte et al. 2007). Die mit pEGFP-Kir2.1-W322C transfizierten Zellen wurden mit Methanol fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen das frühe Endosom (EEA1, Santa Cruz) oder späte Endosom immunozytochemisch (CD63, Santa Cruz) gefärbt.

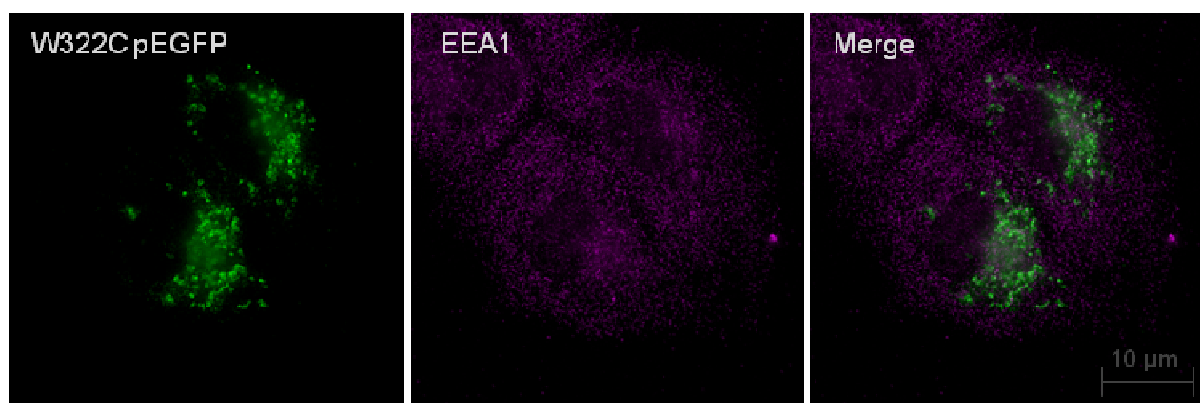


Abbildung 4.2.7-2: Sublokalisierung der Kir2.1-W322C-Kanäle in Cos-7 Zellen.

Cos-7 Zellen wurden mit 1 μ g pEGFP-Kir2.1-W322C Konstrukt transformiert und 8 h nach der Transfektion erfolgte die Fixierung mit Methanol. Im Anschluss an die Permeabilisierung geschah die Färbung mit Antikörpern gegen das frühe Endosom (EEA1). Der W322C mutierte Kanal zeigt keine Lokalisation in den frühen Endosomen.

Der W322C mutierte Kanal zeigt nach 8 h Stunden eine perinukleare Fluoreszenz in relativ großen vesikulären Strukturen (Abbildung 4.2.7-2). Die Lokalisation der W322C-Kanalvariante stimmt nicht mit der Verteilung der frühen Endosomen überein. Während frühe Endosomen gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt sind, sind späte Endosomen meist nahe dem Nukleus lokalisiert. Obwohl der W322C mutierte Kanal eine perinukleare Verteilung zeigt, können nur relativ wenig Kanäle mit den späten Endosomen kolokalisiert werden (siehe Abb. 4.2.7-1 G). Nach 16 h ist dann eine deutliche Lokalisation der W322C mutierten Kanäle in den späten Endosomen nachweisbar, die nach 24 h noch zugenommen hat (Abb. 4.2.7-1 H, I). Schon zuvor konnte ausschließlich eine intrazelluläre Lokalisation und keine Fluoreszenz an der Plasmamembran nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der W322C-Kanal einen defizienten Transport an die Plasmamembran aufweist, intrazellulär in Endosomen verbleibt und schließlich abgebaut wird.

Der WT- und N318S-Kanal zeigt nach 8 h eine deutliche Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum (siehe Abb. 4.2.7-1 A, D). Das EGFP-Signal ist in grün und der ER-Tracker in magenta dargestellt. Eine Kolokalisation ist in weiß sichtbar. Um die Lokalisation der WT-Kanäle und der N318S mutierten Kir2.1-Kanäle an der Plasmamembran zu verdeutlichen, wurden die Zellen mit einem Plasmamembran Marker (NM-DsRed) kotransfiziert. Nach 16 h und 24 h zeigen die WT- und N318S-Kanäle (grün) eine Kolokalisation mit dem NM-DsRed Marker (magentarot) an der Plasmamembran (Abb. 4.2.7-1 B, C, E, F).

5. Diskussion

Arrhythmien sind eine Hauptursache für kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität. Meist werden sie durch Mutationen in kardialen Ionenkanälen oder in akzessorischen Untereinheiten kardialer Ionenkanäle verursacht. Auch wenn schon in vielen Genen Mutationen nachgewiesen werden konnten, können nach wie vor 30-45 % der auftretenden Arrhythmien nicht mit den bisher bekannten Genen erklärt werden (Splawski *et al.*, 2000; Priori *et al.*, 2003).

5.1 Identifizierung und Charakterisierung von Mutationen bei Marburger Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in enger Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg Patienten nach Mutationen in Ionenkanalgenen untersucht. Bei einer Mehrzahl der Patienten konnte das Lange-QT-Syndrom diagnostiziert werden (30 %). Ebenfalls viele Patienten zeigen Kammerflimmern (22 %) und Kammertachykardien (15 %). Zudem wurden Patienten mit Kurzem-QT-Syndrom, Vorhofflimmern, Sick-Sinus-Syndrom, erworbenem LQT-Syndrom und plötzlichem Herztod genetisch untersucht.

Die Identifikation der Mutationen erfolgte mittels PCR-basierter SSCP-Analyse. Dabei beruhte ein wichtiger Teil der Arbeit auf der Etablierung der optimalen PCR- und SSCP-Bedingungen für die verschiedenen Gene. Neben den klassischen LQT-Genen *KCNH2*, *SCN5A*, *KCNJ2* und *KCNE1* wurden auch ausgewählte neue Kandidatengene *KCNJ8*, *KCNJ14*, *SCN2B*, *KCND3*, *KChIP2*, *KCNK3*, *SCN1A* und der Promoterbereich des *SCN5A*-Gens nach Mutationen durchsucht.

Mit Hilfe der SSCP-Analyse konnten zwei Mutationen und ein mit der QT_c-Zeit assoziierter Polymorphismus bei den Marburger Patienten identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die H1153Y-Mutation im Exon 15 des *KCNH2*-Gens, die G269S-Mutation im Exon 6 des *KCNQ1*-Gens und den homozygoten H558R-Polymorphismus im Natriumkanal Nav1.5. Mit 40-55 % sind Mutationen im spannungsgesteuerten Kaliumkanal KvLQT1 für die häufigste Form des LQTS verantwortlich. 20-40 % der Patienten mit einem LQT-Syndrom zeigen Mutationen im *KCNH2*-Gen (Splawski *et al.* 2000) und mit 8-10 % haben Mutationen im Natriumkanal den drittgrößten Anteil an den Ursachen von LQTS (Priori *et al.* 2003) (Napolitano *et al.* 2005). Neben der Identifizierung wurden diese Mutationen und der Polymorphismus in *Xenopus* Oozyten elektrophysiologisch charakterisiert. Außerdem wurde

die H1153Y-Mutation mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Im Folgenden werden die Mutationen und der Polymorphismus diskutiert.

In den ausgewählten neuen Kandidatengenomen konnte keine Mutationen identifiziert werden. Dieses könnte auf die sehr geringe Patientenzahl zurückzuführen sein. Andere Studien untersuchen bis zu 400 Patienten, um Mutationen zu identifizieren (Medeiros-Domingo et al. 2007; Ueda et al. 2008; Vatta et al. 2006). Auch ist es möglich, dass Mutationen mit Hilfe der PCR-basierten SSCP-Analyse nicht detektiert werden konnten, obwohl die Fragmentgröße sehr gering gehalten und verschiedene SSCP-Puffer verwendet wurden. Bei PCR-Produkten von bis zu 200 bp Größe können mittels SSCP-Analyse 70-95 % der Mutationen identifiziert werden (Grompe 1993). Zudem stellen Mutationen in den hier aufgeführten Kandidatengenomen wahrscheinlich nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtheit der LQT-Mutationen dar. Die Etablierung der PCR- und SSCP-Bedingungen und die Untersuchung der 28 Patienten können eher als Beginn der genetischen Analyse gewertet werden. Mit Hilfe der hier geleisteten Etablierungsarbeit können in Zukunft routinemäßig weitere Patienten nach Mutationen in Ionenkanälen untersucht werden. Es wäre möglich, dass auf der Basis dieser Arbeit künftig weitere Mutationen identifiziert werden.

5.1.1 Die H1153Y-Mutation im hERG-Kaliumkanal

Bei dem Indexpatienten 041 konnte die heterozygote H1153Y-Mutation im Exon 15 des hERG-Kaliumkanals mittels PCR-basierter SSCP-Analyse identifiziert werden. Bei dem Patienten wurde ein Sinusknotensyndrom mit Sinusarresten von bis zu fünf Sekunden Dauer diagnostiziert. Dabei zeigt der Patient atypisches Vorhofflattern im Wechsel mit typischem Vorhofflattern und paroxysmalem Vorhofflimmern. Die Familie des Patienten wurde ebenfalls auf das Vorhandensein der Mutation untersucht. Hier konnte die H1153Y-Mutation heterozygot bei einer der beiden Töchter des Indexpatienten nachgewiesen werden. Diese Tochter ist allerdings asymptomatisch und zeigt keine Auffälligkeiten im Belastungs- und Langzeit-EKG.

Die Mutation ist intrazellulär lokalisiert und die am weitesten C-terminal beschriebene Mutation im hERG-Kanal. Ein Abgleich mit der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der Vereinigten Staaten und der Arrhythmie-Datenbank (<http://www.fsm.it/cardmoc>) zeigte, dass die H1153Y-Mutation bereits zuvor beschrieben wurde (Napolitano et al. 2005). Napolitano *et al.* untersuchten 430 Patienten mit LQT-Syndrom und konnten 138 neue Mutationen, darunter den Histidin- nach Tyrosin-Austausch

an Position 1153, identifizieren. Sie definierten eine Mutation als einen DNA-Austausch, der nicht in 400 Kontrollen (800 Allelen) vorhanden ist.

Ein Abgleich mit der Datenbank für eukaryotische lineare Motive ELM (Gould et al. 2010; Puntervoll 2003) zeigte, dass durch die H1153Y-Mutation ein zusätzliches 14-3-3 ϵ -Bindemotiv generiert wird. 14-3-3 ϵ -Proteine wirken an einer Vielzahl von biologischen Prozessen mit (Tzivion und Avruch 2002). Diese ~30 kDa Proteine existieren in Säugetieren in sieben verschiedenen Isoformen, bilden Homo- und Heteromere, wobei ϵ hauptsächlich im Herzen exprimiert wird (Xiao et al. 1995). Die Bindung der 14-3-3 ϵ -Proteine erfolgt an ein Serin-phosphoryliertes Sequenzmotiv (Yaffe et al. 1997). Es existieren zwei unterschiedliche 14-3-3 ϵ Bindemotive (Motiv 1: RSXpSXP; Motiv 2: RXXXpSXP), wobei hier das Motiv 1 generiert wurde (Rittinger et al. 1999). Der hERG-Kanal weist vier PKA-Phosphorylierungsstellen auf (Thomas et al. 1999). Die Phosphorylierung des Serins an Position S²⁸³ im N-Terminus und S¹¹³⁷ im C-Terminus fördert die Bindung von 14-3-3 ϵ an den Kanal (Kagan et al. 2002). Das 14-3-3 ϵ -Protein stabilisiert den phosphorylierten Zustand und erhöht die Aktivität des hERG-Kanals durch die Verschiebung der Kanalaktivierung zu hyperpolarisierenden Membranpotentialen (Kagan et al. 2002). Da die Bindung der 14-3-3 ϵ -Proteine erst nach der Phosphorylierung eines Serin-Restes in der Zielsequenz erfolgt, wurde die Phosphorylierung des H1153Y mutierten Kanals mittels eines Vorhersageprogrammes für Serin-, Threonin- und Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in eukaryotischen Proteinen NetPhos2.0 (Blom et al. 1999) analysiert. Bei der H1153Y-Mutation entsteht eine neue Serin-Phosphorylierungsstelle im Kanal. Es wurden schon C-terminale LQT2-Mutationen beschrieben, welche die 14-3-3 ϵ -Kanalregulation maßgeblich stören (Choe et al. 2006). In einem einzelnen tetrameren hERG-Kanal befinden sich acht potentielle 14-3-3 ϵ Bindestellen. Die Interaktion erfordert, dass das 14-3-3 ϵ -Dimer direkt und gleichzeitig an die beiden Bindestellen im hERG-Kanal bindet und damit cytoplasmatische Quervernetzungen in und zwischen den Untereinheiten schafft. Es wäre möglich, dass die zusätzliche Bindestelle die Aktivität des Kanals steigert oder durch fehlerhafte Bindung einen Funktionsverlust bewirkt. Obwohl die H1153Y-Mutation bereits im Zusammenhang mit einem Längen-QT-Syndrom beschrieben wurde (Napolitano et al. 2005), ist diese bisher noch nicht funktionell charakterisiert. Die elektrophysiologische Charakterisierung der H1153Y-Kanalvariante in *Xenopus* Oozyten zeigte einen signifikanten Funktionsverlust, der auch in Heteromeren nachweisbar ist. Sowohl der homomere als auch der heteromere Kanal zeigen geringere vollständig aktivierte Ströme. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ist nicht verändert.

Der Funktionsverlust des hERG-Kaliumkanals könnte auf einem veränderten Öffnungsverhalten oder einem gestörten Transport an die Plasmamembran basieren. In K_2P -Kanälen reguliert 14-3-3 ϵ durch die Kontrolle des intrazellulären Transports die Anzahl der Kanäle an der Membran (Plant et al. 2005). Eine derartige Regulation des Transports wäre auch für hERG-Kanäle denkbar. Um die Oberflächenexpression des H1153Y-Kanals in *Xenopus* Oozyten zu bestimmen, wurde ein Chemilumineszenz-Versuch durchgeführt. Die H1153Y-Kanalvariante zeigt keine Veränderung in der Oberflächenexpression. Die RLU-Werte entsprechen den für den WT-Kanal gemessenen Werten.

Kanäle mit Mutationen können einen defizienten Transport an die Zellmembran in Säugerzellen aufweisen, auch wenn sie in *Xenopus* Oozyten eine unveränderte Oberflächenexpression zeigen. Daher wurde der Transport der H1153Y-Kanalvariante an die Zellmembran mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der Transport der hERG-Wildtyp und mutierten Kanäle an die Plasmamembran wurde in einem Zeitraum von 8 h bis 36 h verfolgt. Dabei zeigten die hERG-Kanäle nach 24 h eine deutliche und identische Fluoreszenz an der Plasmamembran. Demnach wird die H1553Y-Kanalvariante nicht nur in *Xenopus* Oozyten, sondern auch in Säugerzellen unverändert an die Plasmamembran transportiert.

Die H5513Y-Kanalvariante zeigt im homomeren und heteromeren Kanal einen deutlich geringeren hERG-Strom. Der hERG-Strom entspricht dem I_{Kr} -Strom im Herzen und spielt eine entscheidende Rolle während der Repolarisation des kardialen Aktionspotentials (Sanguinetti et al. 1995). Ein Funktionsverlust des hERG-Kaliumkanals führt zu einer gestörten Repolarisation und dadurch zu einer Verlängerung der Aktionspotentialdauer. Die meisten bisher beschriebenen *KCNH2*-Mutationen, die bei Patienten mit Vorhofflimmern nachgewiesen wurden, führen zu einem „gain-of-function“-Effekt (Hong et al. 2005). Die hier charakterisierte Mutation zeigt einen gegensätzlichen Effekt, sie reduziert die maximale Stromamplitude. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine verlängerte Aktionspotentialdauer atriale Tachyarrhythmien begünstigen kann (Kirchhof et al. 2003). Zudem tritt Vorhofflimmern sowohl bei LQTS (Schott et al. 1995; Mohler et al. 2003) als auch bei SQTS (Gaita et al. 2003) auf. Ferner sind Polymorphismen beschrieben, welche mit VHF assoziiert sind, obwohl sie den I_{Ks} -Strom verringern (Ehrlich et al. 2005).

Neben der H1153Y-Mutation im hERG-Kaliumkanal weist der Patient 041 den S38G-Polymorphismus in der β -Untereinheit minK auf. Lai *et al.* assoziierten diesen *KCNE1*-Polymorphismus in einer taiwanesischen Population mit nicht familiärem Vorhofflimmern (Lai et al. 2002). Patienten mit einem oder zwei 38G-Allelen entwickelten häufiger VHF als

solche, die das 38S-Allel trugen. Ehrlich *et al.* zeigten, dass die minK 38G-Isoform zu einem reduzierten I_{Ks} -Strom führt (Ehrlich et al. 2005).

Es wäre denkbar, dass der Effekt der H1153Y-Mutation durch den Effekt des S38G-Polymorphismus potenziert wird.

5.1.2 Die G269S-Mutation im KvLQT1-Kaliumkanal

Bei dem Patienten 010 konnte die G269S-Mutation im Exon 6 des KvLQT1-Kaliumkanals mittels PCR-basierter SSCP-Analyse identifiziert werden. Der Patient weist eine verlängerte QT_c-Zeit von 0,49 Sekunden auf und bei ihm wurde ein angeborenes Langes-QT-Syndrom diagnostiziert.

Die G269S-Mutation ist im mittleren Bereich des S5-Segments des Kanals lokalisiert. Das S5-Transmembransegment entspricht der äußeren Helix des prokaryotischen Kaliumkanals KcsA und ist hoch konserviert in Prokaryoten und Eukaryoten (Doyle et al. 1998). Zusammen mit dem S6-Segment bildet es die kaliumselektive Pore. Der mittlere Teil des S5-Segments, in welchem die Mutation lokalisiert ist, liegt im geschlossenen Zustand nahe dem unteren Teil der Porenhelix, der in die Pore hineinragt (Smith et al. 2007). Viele KvLQT-Mutationen können im S5-, S5/P-, P- und S6-Segment identifiziert werden (Splawski et al. 2000). Mutationen in diesen Regionen stören den Kaliumtransport, verändern das Öffnungsverhalten des Kanals und modifizieren die KvLQT1-Interaktion mit der β -Untereinheit minK (Chouabe et al. 2000; Panaghie et al. 2006; Franqueza et al. 1999; Wang et al. 1999; Tapper und George 2001).

Die Mutation ist innerhalb der *KCNQ*-Familie hoch konserviert. Ein Abgleich mit der Datenbank des National Center for Biotechnology Information der Vereinigten Staaten (NCBI) und der Arrhythmie Datenbank (<http://www.fsm.it/cardmoc>) zeigte, dass die G269S-Mutation bereits in anderen Patienten mit LQT-Syndrom identifiziert werden konnte (Murray et al. 2002; Choi et al. 2004; Ackerman et al. 1999; Chen et al. 2003; Creighton et al. 2006). Ackermann *et al.* beschrieben die G269S-Mutation als erste bei einem asymptomatischen 16 Jahre alten Jungen mit einer QT_c-Zeit von 0.47 s, der nach dem Beinahe-Ertrinken seines Cousins evaluiert wurde (Ackerman et al. 1999). Die Untersuchung von 100 Kontrollen zeigte, dass es sich um eine Mutation und keinen Polymorphismus handelt. Im Rahmen dieser Studie untersuchten Ackermann *et al.* sechs voneinander unabhängige Fälle, die eine familiäre Vorgeschichte für durch Schwimmen hervorgerufene kardiale Ereignisse aufwiesen. In allen Fällen konnte eine Mutation im KvLQT1-Kanal nachgewiesen werden. Chen *et al.*

identifizierten die G269S-Mutation ebenfalls bei einem 14 jährigen Jungen, der beim Schwimmen einen Herzstillstand erlitten hatte (Chen et al. 2003). Beim LQTS gibt es genspezifische Faktoren, die zu kardialen Ereignissen führen. Patienten mit LQT1 zeigen Arrhythmien unter körperlicher Belastung, wohingegen kardiale Ereignisse bei Patienten mit LQT2 und LQT3 durch emotionalen Stress und während des Schlafens ausgelöst werden (Schwartz et al. 2001). Schwimmen stellt einen LQT1 spezifischen arrhythmischen Auslöser dar (Moss et al. 1999; Ackerman et al. 1999; Ackerman et al. 1998; Ackerman und Porter 1998).

Die G269S-Mutation wurde bereits in früheren Studien funktionell charakterisiert, allerdings wurde die Assemblierung mit der β -Untereinheit minK bisher noch nicht untersucht (Murray et al. 2002).

Die funktionelle Charakterisierung der G269S-Mutation in *Xenopus* Oozyten zeigte, dass die Injektion des mutierten Kanals allein in einen Strom resultiert, der im Vergleich mit dem WT-Strom um 60 % reduziert war. Da die Mutation bei dem Patienten 040 heterozygot vorliegt und vier KvLQT1-Untereinheiten einen funktionellen Kanal bilden, wurde der mutierte Kanal zudem zusammen dem WT-Kanal exprimiert. Zur Beurteilung, ob ein dominant negativer Effekt vorliegt, wurde ebenfalls die Hälfte der WT cRNA Menge injiziert (50 % WT). Die G269S-Kanalvariante zeigt keinen dominant negativen Effekt. Die Stromamplitude entspricht der von 50 % WT. Murray *et al.* zeigten ebenfalls den Funktionsverlust der G269S-Kanalvariante allein und konnten auch keinen dominant negativen Effekt nachweisen (Murray et al. 2002). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen resultierte die Injektion der Kanalvariante zusammen mit dem WT in Strömen, die vom 100 % WT nicht zu unterscheiden waren. Die Interaktion mit minK wurde von Murray *et al.* nicht untersucht.

In kardialen Myozyten assembliert der KvLQT1-Kanal mit der *KCNE1* β -Untereinheit (minK) und erzeugt einen Strom, der dem verzögert öffnenden Kaliumstrom I_{Ks} im Herzen entspricht (Barhanin et al. 1996; Sanguinetti et al. 1996). Die Koexpression des G269S-Kanals mit der β -Untereinheit minK in *Xenopus* Oozyten zeigt, dass die Mutation zu einer defekten Assemblierung mit minK führt. Der Strom ist nicht von dem Strom des reinen minK zu unterscheiden. Bei der alleinigen Injektion von minK ist ein I_{Ks} -Strom sichtbar, da minK mit dem endogenen KvLQT1-Kanal der Oozyten assembliert (Sanguinetti et al. 1996). Auch bei dem mutierten Kanal ist wahrscheinlich nur aufgrund des endogenen KvLQT1 der I_{Ks} -Strom sichtbar.

Mutationen im KvLQT1-Kanal, die zu einer dominanten Form des Romano-Ward-Syndroms (RWS) führen, zeigen normalerweise einen Funktionsverlust und einen dominant negativen Effekt (Wollnik et al. 1997; Chouabe et al. 1997; Shalaby et al. 1997; Bianchi et al. 2000; Wang et al. 1999). Die G269S-Kanalvariante bewirkt zwar einen Funktionsverlust, zeigt aber keinen dominant negativen Effekt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die G269S-Untereinheiten nicht mit den WT-Untereinheiten des KvLQT1-Kanals und der β -Untereinheit minK interagieren können. Es wäre möglich, dass die mutierten Untereinheiten nicht korrekt gefaltet werden können und daher schnell abgebaut werden. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Untereinheiten zwar korrekt gefaltet werden, aber nicht mit den WT-Untereinheiten assemblieren können. Smith *et al.* mutmaßten anhand eines Strukturmodelles für die G269S-Mutation eine fehlerhafte Faltung und einen gestörten Transport an die Plasmamembran (Smith et al. 2007). Die bereits in früheren Studien beschriebene und charakterisierte E261K-Mutation verhält sich ähnlich (Franqueza et al. 1999). Auch sie weist keinen dominant negativen Effekt auf und scheint nicht mit den KvLQT1-WT-Untereinheiten und der β -Untereinheit minK assemblieren zu können. Die E261K-Kanalvariante zeigt einen gestörten Transport an die Plasmamembran und verbleibt im Endoplasmatischen Retikulum (Wilson et al. 2005).

Die elektrophysiologischen Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der G269S-Mutation um eine rezessive Form des Romano-Ward-Syndroms handelt. Allerdings verlängert die Mutation auch bei heterozygoten Trägern die QT_c-Zeit in hochnormale Bereiche. Bis auf die Verlängerung der QT_c-Zeit scheint die Mehrzahl der heterozygoten Träger asymptomatisch zu sein. Synkopen sind nur bei homozygoten Patienten beschrieben (Ackerman und Porter 1998; Reardon et al. 1993). In anderen Fallberichten ist nicht geklärt, ob die Mutation homozygot oder heterozygot vorlag (Choi et al. 2004; Chen et al. 2003; Creighton et al. 2006). Der Patient 040 ist ebenfalls asymptomatisch. Das Lange-QT-Syndrom wurde zufällig diagnostiziert, als bei ihm aufgrund der operativen Versorgung einer Mittelfußfraktur ein EKG durchgeführt wurde. Bisher sind zwei weitere rezessive RWS-Familien mit einer R533W-Mutation bzw. einer A300T-Mutation im KvLQT1-Kanal beschrieben (Chouabe et al. 2000; Bianchi et al. 2000; Priori et al. 1998).

5.1.3 Der H558R- und IVS9-3-C>A-Polymorphismus im Nav1.5-Natriumkanal

Beim Patienten 040 konnte der IVS9-3-C>A-Polymorphismus im Intron 9 und der H558R-Polymorphismus im Exon 12 des *SCN5A*-Gens mittels PCR-basierter SSCP-Analyse identifiziert werden. Der Patient 040 weist monomorphe Kammertachykardien mit Verdacht auf Mikroentry im posterioren linken Ventrikel auf. Nach Amiodaronaufsättigung zeigte er rezidivierende *Torsades de pointes* Tachykardien und Kammerflimmern bei dem Long-QT-Syndrom. Der H558R-Polymorphismus ist im cytoplasmatischen Linker, der die erste und zweite Domäne des Natriumkanals verbindet, lokalisiert. Ein Abgleich mit der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) der Vereinigten Staaten und der Arrhythmie-Datenbank (<http://www.fsm.it/cardmoc>) zeigte, dass der H558R-Polymorphismus bereits zuvor beschrieben wurde (Aydin et al. 2005; Iwasa et al. 2000; Yang et al. 2002; Takahata et al. 2003).

Aydin *et al.* wiesen eine Assoziation des H558R-Polymorphismus mit der QT_c-Zeit nach (Aydin et al. 2005). Ebenfalls eine Assoziation des Polymorphismus mit der QT_c-Zeit konnten Gouas *et al.* zeigen. Sie untersuchten zwei Gruppen von jeweils 200 Individuen, welche die kürzeste und die längste QT_c-Zeit aus einer Gruppe von 2008 gesunden Kontrollen repräsentieren. Der H558R-Polymorphismus wies eine deutlich höhere Frequenz in der Gruppe mit der längeren QT_c-Zeit auf (Gouas et al. 2005). Ebenso konnten Gouas *et al.* eine Assoziation des IVS9-3-Polymorphismus mit einer verlängerten QT_c-Zeit nachweisen. Beide Polymorphismen stellen Risikofaktoren für eine QT-Verlängerung und die Entstehung von Arrhythmien bei Patienten mit LQT-Syndrom dar.

Zudem ist der H558R-Polymorphismus mit Vorhofflimmern assoziiert (Chen, et al. 2007). Chen *et al.* untersuchten 157 Patienten mit Vorhofflimmern und 314 Patienten im Sinusrhythmus. Sie konnten einen signifikanten Frequenzunterschied der drei H558R Genotypen (HH, HR, RR) zwischen der Gruppe mit Vorhofflimmern und den Kontrollen zeigen (50 vs 63 %, 40 vs 33 % und 10 vs 4 %). Eine Reduktion in der Natrium-Stromdichte könnte zu einer verringerten Kontraktionsgeschwindigkeit der Vorhöfe führen, kreisende Erregungen begünstigen und dadurch Vorhofflimmern unterstützen. Außerdem konnte eine Allel-assoziierte Reduktion des Natriumstroms bei Patienten mit Brugada-Syndrom nachgewiesen werden (Lizotte et al. 2009; Chen et al. 2004).

Die Untersuchung von 400 unabhängigen Kontrollpersonen ergab eine Genfrequenz von 0,33 für heterozygote und 0,04 für homozygote Träger für den IVS9-3-Polymorphismus und von 0,36 (heterozygot) und 0,06 (homozygot) für den H558R-Polymorphismus. Anhand der

Genfrequenzen wurden die Allelfrequenzen berechnet. Der IVS9-3-Polymorphismus besitzt eine Allelfrequenz von 0,20 und der H558R-Polymorphismus von 0,23. Diese Werte entsprechen den in der Literatur angegebenen Allelfrequenzen von 0,21 und 0,25 (Gouas et al. 2005).

Anhand der Allelfrequenzen wurden unter der Annahme der freien Rekombinierbarkeit die erwarteten Frequenzen der Genotypen berechnet (siehe Tabelle 3.1.5-2). Außerdem wurden die Frequenzen der Genotypen anhand der Ergebnisse der SSCP-Analyse der 400 Kontrollen bestimmt. Diese tatsächlichen Frequenzen der verschiedenen Genotypen weichen stark von den erwarteten Frequenzen ab. Auf Grundlage der tatsächlichen Häufigkeiten der Genotypen wurde das Kopplungsungleichgewicht (LD) bestimmt. Das LD von 0,88 entspricht einer starken Assoziation der beiden Polymorphismen.

Der Effekt des H558R-Polymorphismus kann aufgrund des starken Kopplungsungleichgewichts (LD) nicht unabhängig vom IVS9-3 Cytosin-zu-Adenin Austausch betrachtet werden. Dieser letztere SNP ist in der Akzeptor-Spleißstelle des Introns 9 lokalisiert. Ein Cytosin an der Position -3 ist an der 3`Spleißstelle zu 78 % konserviert (Padgett et al. 1986), demnach könnte ein Austausch an dieser Position das Spleißing verändern. Analysen verschiedener Vorhersageprogramme bestätigten diese Annahme (Desmet et al. 2009; Dogan et al. 2007; Brunak et al. 1991). Auch Gouas *et al.* mutmaßten, dass der IVS9-3-Polymorphismus Auswirkungen auf das Spleißing haben könnte (Gouas et al. 2005). Veränderungen des pre-mRNA Spleißings repräsentieren einen bedeutenden Mechanismus, durch den Genmutationen Krankheiten auslösen können (Baralle et al. 2009).

Die Auswirkung des C>A Austausches auf das Spleißing wurden mit Hilfe des gut etablierten α -Globin-Fibronectin-EBD-Minigen-Systems untersucht. Das ursprüngliche α -Globin-Fibronectin-EBD-Minigen-System (Muro et al. 1999; Caputi et al. 1994) wurde modifiziert, indem das EBD-Exon entfernt wurde, um eine Stelle für die Insertion von Exonen zu generieren (Pagani et al. 2000). Das Minigen enthält 3 kb intronische und exonische Fragmente des humanen Fibronectin-Gens, welche in das Exon 3 des humanen α -Globin-Gens inseriert wurden. In dieses System können verschiedene Exone mit flankierenden intronischen Sequenzen über *NdeI*-Schnittstellen eingebracht werden, um das Spleißing von Sequenzvarianten zu untersuchen.

Baralle *et al.* analysierten anhand dieses Minigen-Systems das Spleißing des Neurofibromatose (NF1)-Gens (Baralle 2003). Auch der Effekt der RNA-Prozessierung der T1945+6C-Mutation im *KCNH2*-Gen wurde mittels des Minigens untersucht (Zhang et al.

2004). Diese intronische Mutation verändert das Spleißing, wodurch das Intron 7 verbleibt und in einem nicht funktionellen Kanal resultiert, der zum Langen-QT-Syndrom führt.

Das Exon 10 des *SCN5A*-Gen wurde mit 200 bp flankierenden intronischen Bereichen in das α -Globin-Fibronektin-EBD-Minigen-System kloniert und in HEK-293 Zellen exprimiert. Mit der isolierten RNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Die RT-PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese und Sequenzierung analysiert. Das Spleißing wird durch den C>A Austausch nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Polymorphismus zwar gekoppelt mit dem IVS9-3 C>A Austausch vererbt wird, dieser aber keinen Einfluss auf den Natriumkanal hat. Daher kann der H558R-Polymorphismus getrennt von dem intronischem SNP analysiert werden.

Die funktionelle Charakterisierung des Polymorphismus erfolgte in *Xenopus* Oozyten. Dabei wurde auf die Auswahl des Expressionshintergrundes besonderen Wert gelegt. Der Effekt des H559R-Polymorphismus wird durch das alternative Spleißing einer distalen Stelle des Natriumkanals beeinflusst. Das alternative Spleißing führt zu einer kürzeren Spleißvariante (2015 Aminosäuren), der das Glutamin an Position 1077 fehlt (Q1077del.) (Makielski et al. 2003). Diese Spleißvariante macht 65 % der Transkripte im Herzen aus. In einem heterologen Expressionssystem führten der H558R-Polymorphismus zusammen mit der 2016 Aminosäuren langen Variante, die an Position 1077 ein Glutamin aufweist, zu einer deutlichen Reduktion der Stromdichte. In der kürzeren Spleißvariante zeigt das R558-Allel allerdings keine Effekte. Zudem wurde in dieser Studie gezeigt, dass die existierenden Klone (hH1, hH1a, hH1b) alle sehr seltene Varianten repräsentieren und keine den häufigen Sequenzen entsprechen (vgl. Tabelle 1.5-1). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Auswahl des Sequenzhintergrundes für die Messungen in heterologen Expressionssystemen entscheidend ist.

Die Sequenzierung des Exons 18 der genomischen DNA des Patienten 010 zeigte, dass der Patient die seltenere und längere Spleißvariante, die an Position 1077 ein Glutamin aufweist, besitzt. Daher erfolgte die funktionelle Charakterisierung des H558R-Polymorphismus im hH1-Hintergrund, der als einziger ein Q an Position 1077 aufweist.

Die funktionelle Charakterisierung der H558R-Kanalvariante im hH1-Hintergrund zeigte eine signifikante Erhöhung der Stromamplitude um ungefähr 25 %. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung ist nicht verändert. Zudem ist der späte Natriumstrom mit dem späten WT-Strom vergleichbar. Nur eine etwas schnellere Erholung von der Inaktivierung kann beobachtet werden. Diese ist allerdings nicht signifikant.

In der Literatur konnte bisher immer nur eine Reduktion des Stroms oder kein Effekt beobachtet werden (Makielski et al. 2003; Viswanathan et al. 2003). Diese Ergebnisse können zwar die Assoziation des Polymorphismus mit Vorhofflimmern und dem Brugada-Syndrom begründen (Lizotte et al. 2009; Chen et al. 2004; Chen et al. 2007), aber nicht die Assoziation mit einer verlängerten QT_c-Zeit (Gouas et al. 2005). Der hier beschriebene „gain-of-function“-Effekt des H558R-Polymorphismus korreliert mit einer längeren Dauer des Aktionspotentials und damit mit einer verlängerten QT_c-Zeit im EKG. Der H558R-Polymorphismus könnte zu einer herabgesetzten Repolarisationsreserve führen. Roden *et al.* beschrieben eine verminderte Repolarisationsreserve als einen generellen Mechanismus, der zu einem medikamenteninduzierten LQT-Syndrom führen kann (Roden 1998). Meist verringern Mutationen oder Polymorphismen in Kaliumkanälen die Repolarisationsreserve. Es sind aber auch medikamenteninduzierte LQT-Syndrome in Verbindung mit SCN5A-Mutationen beschrieben (Makita et al. 2002). Der homozygote H558R-Polymorphismus bewirkt einen erhöhten Natriumeinstrom während der kardialen Repolarisation und könnte dadurch das Aktionspotential verlängern oder die Repolarisationsreserve herabsetzen. Klasse-III-Antiarrhythmika wie Amiodaron blockieren den hERG-Kaliumkanal und verlängern nachweislich das QT-Intervall (Kiehn et al. 1999; Abriel et al. 2004). Durch die Gabe von Amiodaron wurden möglicherweise zusätzlich die hERG-Kaliumkanäle blockiert und dadurch die QT-Intervall Verlängerung potenziert, so dass rezidivierende *Torsades de pointes* Tachykardien und Kammerflimmern bei dem Langen-QT-Syndrom auftraten.

5.2 Charakterisierung einer neuen LQT-Form

Der zweite Teil der Arbeit umfasste die funktionelle Charakterisierung einer neuen LQT-Form. Das Andersen-Syndrom ist eine Multisystemerkrankung und ist charakterisiert durch einen kardialen Phänotyp, periodische Paralyse und verschiedene Dysmorphologien. Die Dysmorphologien umfassen eine kurze Statur, Skoliose, Klinodaktylie, Syndaktylie, Brachydaktylie, Hypertelorismus, niedrige oder geneigte Ohren, Kieferanomalien und eine ausgeprägte Stirn (Tawil et al. 1994). 60-70 % der Patienten mit Andersen-Syndrom weisen eine Mutation im Kir2.1-Kanal auf (Tristani-Firouzi et al. 2001). Mutationen bewirken eine Reduktion des I_{K1} -Stroms, wodurch das Aktionspotential in den Myozyten verlängert wird. Durch diese Destabilisierung und Depolarisierung des Ruhemembranpotentials werden ventrikuläre Arrhythmien oder Kontraktionen der myotonen Skelettmuskeln gefördert

(Tristani-Firouzi et al. 2001; Plaster et al. 2001). Beim Andersen-Syndrom handelt es sich um eine autosomal dominante Krankheit. Alle bisher beschriebenen Kir2.1-Mutationen bewirken einen kompletten Funktionsverlust und zeigen einen dominant negativen Effekt auf Wildtyp Kanaluntereinheiten. Auch haben die Mutationen im Kir2.1-Kanal einen dominant negativen Effekt auf andere Kanäle der Kir2.x-Familie (Preisig-Müller et al. 2002) und könnten den sehr pleiotropen Phänotyp der Krankheit erklären.

Die *KCNJ2*-Mutationen N318S und W322C wurden von Prof. E. Schulze-Bahr aus Münster identifiziert. In einem Kontrollkollektiv von 400 Personen waren diese beiden Aminosäureaustausche nicht vorhanden. Anders als die bisher beschriebenen Patienten mit *KCNJ2*-Mutationen zeigen die hier analysierten Patienten ausschließlich einen kardialen Phänotyp. Eine Multisystemerkrankung liegt nicht vor, da ein Phänotyp des Skelettmuskels und Dysmorphologien nicht gefunden werden konnten. Dieser einzigartige Phänotyp konnte in dieser Arbeit mit den funktionellen Eigenschaften der mutierten Kir2.1-Kanäle erklärt werden.

Die beiden Mutationen sind die am weitesten C-terminal beschriebenen Mutationen. Der Aminosäurerest Tryptophan³²² ist innerhalb der Kir-Familie hoch konserviert. Dahingegen zeigt der Aminosäurerest Asparagin³¹⁸ keine Konservierung innerhalb der Kir-Familie.

Betrachtet man die Lokalisation der beiden Mutationen in der Kristallstruktur des humanen Kir2.1-Kanals (Pegan et al. 2005), nehmen sie eine Sonderstellung innerhalb der bisher beschriebenen C-terminalen Kir2.1-Mutationen ein. Der Kir2.1-Kanal ist aus einer oberen Transmembranregion und einer unteren cytoplasmatischen Domäne aufgebaut. Die N- und C-Termini bilden die cytoplasmatische Pore. Die Mutationen N216H, G300V, E303K und R312C (Donaldson et al. 2003; Tristani-Firouzi et al. 2002) sind im oberen Bereich innerhalb der cytoplasmatischen Pore lokalisiert und weisen zur Plasmamembran. Dahingegen sind die Mutationen N318S und W322C seitlich der cytoplasmatischen Region lokalisiert. Schon diese einzigartige Lokalisation lässt vermuten, dass diese Mutationen sich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften von den anderen Mutationen unterscheiden.

Die elektrophysiologische Charakterisierung in *Xenopus* Oozyten ergab, dass die N318S- und W322C-Kanalvariante, anders als alle bisher beschriebenen Andersen-Mutationen, keinen absoluten Funktionsverlust zeigen, auch wenn sich die beiden Kanalvarianten in ihrer Stromgröße unterscheiden. Der N318S mutierte Kanal zeigt Ströme, die nicht vom WT zu unterscheiden sind, dagegen sind bei dem W322C mutierten Kanal die Ströme um 60 % reduziert. Da die betroffenen Individuen ein normales und ein mutiertes *KCNJ2*-Allel aufweisen, entsprechen diese experimentellen Bedingungen jedoch nicht der tatsächlichen

Situation. Um den heterozygoten Zustand der Patienten nachzubilden und um zu überprüfen, ob die Kanalvarianten einen dominant negativen Effekt auf die Kir2.1-WT-Kanäle ausüben, wurden die mutierten Kanäle zusammen mit WT-Kanälen koexprimiert. Beide Mutationen haben keinen dominant negativen Effekt auf. Sie zeigen zusammen mit den Wildtyp-Untereinheiten Ströme, die im Vergleich zu dem WT-Strom um 20 bis 25 % reduziert sind. Auch hierbei unterscheiden sie sich maßgeblich von allen bisher beschriebenen Andersen-Mutationen. Diese zeigen alle einen dominant negativen Effekt (Andelfinger et al. 2002; Donaldson et al. 2003; Tristani-Firouzi et al. 2002; Plaster et al. 2001; Bendahhou et al. 2003; Ai et al. 2002; Hosaka et al. 2003). Das Ausbleiben dieses dominant negativen Effektes könnte das Fehlen der für das Andersen-Syndrom typischen Dysmorphologien und der periodischen Paralyse erklären.

Kir2.1-Kanäle können funktionelle Heteromere mit Kir2.2-, Kir2.3- und Kir2.4-Kanälen bilden. Eine Expression im Herzen konnte für Kir2.2 und Kir2.3 nachgewiesen werden. Alle Andersen-Mutationen, die bisher analysiert wurden, unterdrücken bei Koexpression die Kir2.2- und Kir2.3-Ströme. Die in dieser Arbeit charakterisierte N318S- und W322C-Kanalvariante weisen dagegen keinen dominant negativen Effekt auf die Kir2.2- und Kir2.3-Kanäle auf. Dies könnte den untypischen Phänotyp erklären.

Der Funktionsverlust der Kir2.1-Kanäle kann neben einem veränderten Öffnungsverhalten oder einer verminderten Affinität für PIP₂ durch einen gestörten Transport an die Plasmamembran hervorgerufen werden. Um die Ursache des Funktionsverlustes zu klären, wurde die Oberflächenexpression der Andersen-Mutanten in *Xenopus* Oozyten mittels eines Chemilumineszenz-Versuches bestimmt. Hierbei zeigt die N318S-Kanalvariante eine Oberflächenexpression, die vom WT nicht zu unterscheiden ist. Die W322C-Kanalvariante weist hingegen signifikant geringere RLU-Werte als der Kir2.1-WT-Kanal auf. Die Oberflächenexpression in *Xenopus* Oozyten ist bei der Andersen-Mutation W322C gestört. Der Funktionsverlust der W322C-Mutation könnte durch einen gestörten Transport an die Plasmamembran hervorgerufen werden.

Kanäle mit Mutationen können einen defizienten Transport an die Zellmembran in Säugerzellen aufweisen, auch wenn sie in *Xenopus* Oozyten eine unveränderte Oberflächenexpression zeigen. Daher wurde der Transport an die Zellmembran für beide Kanalvarianten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Alle Versuche wurden in Cos-7 Zellen durchgeführt, da in diesen Zellen die unterschiedlichen Kompartimente gut zu unterscheiden sind. Im Gegensatz zum WT-Kanal und zum N318S mutierten Kanal zeigt der W322C mutierte Kanal keine Fluoreszenz an der Plasmamembran, aber eine intrazelluläre

Verteilung. Auch wenn der W322C mutierte Kanal zusammen mit Kir2.1-WT-Kanal transfiziert wird, verbleibt die Mutante intrazellulär. Der Wildtyp-Kanal wird unverändert an die Membran transportiert und nicht vom W322C mutierten Kanal beeinflusst. Es scheint, dass der Kanal nicht nur einen Trafficking-, sondern auch einen Assemblierungs-Defekt aufweist.

Um die subzelluläre Lokalisation der W322C-Kanalvariante genauer zu bestimmen, wurden die Cos-7 Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen das frühe und späte Endosom gefärbt. Der W322C mutierte Kanal zeigt zu allen Zeitpunkten eine perinukleare Verteilung in relativ großen vesikulären Strukturen. Späte Endosomen sind oft in der Nähe des Nukleus orientiert, während frühe Endosomen in sehr kleinen vesikulären Strukturen über die gesamte Zelle verteilt sind. Eine Kolokalisation konnte nur mit den späten Endosomen gezeigt werden. Diese nahm mit der Zeit zu. Wahrscheinlich werden die mutierten Kanäle sehr schnell von den frühen in die späten Endosomen transportiert, so dass keine Lokalisation in den frühen Endosomen nachweisbar war. Anschließend werden die mutierten Kanäle möglicherweise abgebaut.

Bisher sind nur vier verschiedene Mutationen (Δ 95-98, C101R, V302M und Δ 314-315) im Kir2.1-Kanal beschrieben, die einen gestörten Transport an die Plasmamembran aufweisen (Bendahhou et al. 2003; Ballester et al. 2006). Mit der hier charakterisierten W322C-Mutation sind nun fünf solcher Mutationen bekannt.

Bendahhou *et al.* zeigten, dass die Aminosäure Trp³²² eine entscheidende Rolle beim Transport an die Plasmamembran spielt (Bendahhou et al. 2003). Sie mutierten die Aminosäuren 290 bis 325 zu Alanin und untersuchten das Trafficking-Verhalten. Dabei zeigten die Mutationen der Aminosäurereste Leu³¹⁶, Glu³¹⁹, Ile³²⁰, Leu³²¹ und Trp³²² eine intrazelluläre Verteilung. Die Autoren vermuteten, dass diese Aminosäure-Reste ein Teil eines für den Transport des Kir2.1-Kanals an die Zellmembran wichtigen Bindemotivs sind.

Im Homomer erzeugt der N318S mutierte Kanal einen Strom, der nicht vom WT zu unterscheiden ist. Bei der Expression mit den Wildtyp-Untereinheiten kommt es aber zu einem Funktionsverlust von 20-25 %. Wenn vier N318S-Untereinheiten assemblieren, hat dies keine funktionellen Auswirkungen auf den Kanal. Dagegen verändert die Zusammenlagerung der mutierten Untereinheiten mit den WT-Untereinheiten die Eigenschaften des heteromeren Kanals. Möglicherweise nimmt die mutierte Untereinheit eine andere Konformation als die WT-Untereinheit ein. Im Homomer passen die mutierten Untereinheiten gut zusammen. Anders verhält es sich im Heteromer, hier könnte es zu einer

strukturellen Konformationsänderung des Kanals kommen, welche den Ionenfluss durch den Kanal beeinflusst.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit der neue klinische Phänotyp mit den funktionellen Eigenschaften der mutierten Kanäle korreliert werden. Beide Mutationen sind sehr weit C-terminal gelegen und zeigen eine sehr ähnliche Lokalisation im Kir2.1-Kristall. Im Heteromer bewirken beide Kanalvarianten einen 20-25 % Funktionsverlust. Damit grenzen sie sich von allen bisher beschriebenen Andersen-Mutationen ab. Der neue klinische Phänotyp kann mit den besonderen funktionellen Eigenschaften der mutierten Kanäle erklärt werden. Daher sollte das hier beschriebene Krankheitsbild, bei dem es sich nicht um eine Multisystemerkrankung handelt, als eine neue Unterform des LQT7 eingeordnet werden.

Zusammenfassung

Das Lange-QT-Syndrom ist charakterisiert durch ein längeres QT-Intervall im Elektrokardiogramm. Frühe Nachdepolarisationen können zu lebensbedrohlichen *torsade de pointes* Tachykardien führen, die in Synkopen resultieren oder in Kammerflimmern übergehen und das Risiko für den plötzlichen Herztod drastisch erhöhen.

In dieser Arbeit wurde bei Marburger Patienten mit Hilfe der PCR-basierten SSCP-Analyse nach Mutationen in 14 verschiedenen Genen gesucht. Es ist gelungen, eine heterozygote Mutation im hERG-Kanal sowie eine weitere im KvLQT1-Kanal und einen mit der QT_c-Zeit assoziierten homozygoten Polymorphismus im Nav1.5-Kanal zu identifizieren. Die funktionelle Charakterisierung der H1153Y-Kanalvariante in *Xenopus* Oozyten zeigte einen Funktionsverlust und keinen dominant negativen Effekt auf Wildtyp-Kanäle. Die Leitfähigkeits-Spannungs-Beziehung ist unverändert. Der Transport an die Zellmembran ist weder in *Xenopus* Oozyten noch in Säugerzellen gestört. Die funktionelle Charakterisierung der G269S-Kanalvariante zeigte in *Xenopus* Oozyten einen 60 % Funktionsverlust, ohne einen dominant negativen Effekt auf die Wildtyp-Kanäle zu haben. Zudem ist die Assemblierung mit der β -Untereinheit minK gestört. Der H558R-Polymorphismus im Natriumkanal Nav1.5 ist mit einer Verlängerung der QT_c-Zeit assoziiert. Zusammen mit dem H558R-Polymorphismus konnte der IVS9-3-C>A-Polymorphismus in der Akzeptor-Spleißstelle identifiziert werden. Die Untersuchung von 400 Kontrollpersonen zeigte, dass beide Polymorphismen gekoppelt vorliegen. Das Spleißing des IVS9-3-Polymorphismus wurde mittels eines α -Globin-Fibronektin-EBD-Minigen-Systems analysiert. Ein fehlerhaftes Spleißing konnte ausgeschlossen werden. Die funktionelle Charakterisierung in *Xenopus* Oozyten im hH1-Hintergrund zeigte im Vergleich mit dem Wildtyp-Kanal eine um 25 % erhöhte Stromamplitude. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung und der Inaktivierung, die Erholung von der Inaktivierung sowie die späten Natriumströme sind unverändert.

Zudem konnte in dieser Arbeit erstmals eine neue Form des Andersen-Syndroms funktionell charakterisiert werden. Das Andersen-Syndrom als eine Multisystemerkrankung ist charakterisiert durch periodische Paralyse, einen kardialen Phänotyp und verschiedene Dysmorphologien. Die Träger der Mutationen N318S und W322C im Kir2.1-Kaliumkanal zeigen ausschließlich einen kardialen Phänotyp. Die für das Andersen-Syndrom typischen Dysmorphologien und die periodische Paralyse sind in den beiden untersuchten Patienten

nicht vorhanden. In dieser Arbeit ist es gelungen, den neuen klinischen Phänotyp mit den funktionellen Eigenschaften der mutierten Kanäle zu begründen.

Die Mutationen sind die bisher am weitesten C-terminal beschriebenen Mutationen und zeigen eine ungewöhnliche Lokalisation im humanen Kir2.1-Kanal. Anders als alle bisher beschriebenen Andersen-Mutationen zeigen die mutierten Kanäle keinen absoluten Funktionsverlust und keinen dominant negativen Effekt auf Untereinheiten des Wildtyp-Kanals. Im Homomer ist die N318S-Kanalvariante nicht vom Wildtyp zu unterscheiden, die W322C-Kanalvariante zeigt einen 60 % Funktionsverlust. Der Funktionsverlust basiert bei dem W322C-Kanal auf einem defizienten Transport an die Plasmamembran. Dieses konnte mittels eines Chemielumineszenz-Versuches in *Xenopus laevis* Oozyten und Fluoreszenzmikroskopie in Säugerzellen nachgewiesen werden. Durch Immunocytochemie konnte gezeigt werden, dass der Kanal perinuklear in den späten Endosomen lokalisiert ist und wahrscheinlich degradiert wird. Bei beiden Patienten liegen die Mutationen heterozygot vor. Die funktionellen Eigenschaften der mutierten Kanäle sind unter diesen heterozygoten Bedingungen identisch. Beide Kanalvarianten zeigen zusammen mit den WT-Untereinheiten nur einen 20-25 % Funktionsverlust und damit keinen dominant negativen Effekt. Zudem zeigen sie keinen dominant negativen Effekt auf die Kanäle der Kir-Familie Kir2.2 und Kir2.3. Diese ungewöhnlichen elektrophysiologischen Eigenschaften der mutierten Kanäle könnten den ausschließlich kardialen Phänotyp der Patienten erklären. Eine Einordnung des beschriebenen Krankheitsbildes als Unterform des LQT7 wird angestrebt.

Summary

Long QT syndrome is characterized by prolongation of the QT interval on electrocardiogram. Early after depolarisations may develop to *torsade de pointes* degenerating into ventricular fibrillation and cause sudden cardiac death. In the present study Marburg patients were screened for mutations in 14 ion channel genes by PCR-based SSCP-analysis. One heterozygote mutation in hERG potassium channel, one heterozygote mutation in KvLQT1 potassium channel as well as one polymorphism in the Nav1.5 sodium channel, that is associated with longer QT_c interval, were identified. The functional characterization of the H1153Y channel in *Xenopus* oocytes showed a minimal loss of channel function and no dominant negative effect on wildtype channel. However, mutant hERG channel subunits indicated normal trafficking to the plasma membrane in oocytes and mammalian cells. The functional characterization of the G269S channel in *Xenopus* oocytes represented a 60 % current reduction when expressed alone and no dominant negative effect could be observed when co-expressed with wildtype channel. Also the mutant channel shows an assembly defect with the β -subunit minK. The common H558R polymorphism in the sodium channel *SCN5A* gene is associated with the QT_c length. It is not possible to disentangle the effect of the H558R polymorphism from that of the 1141-3 C>A SNP because of their tight LD. This latter SNP is located in the acceptor splice site in intron 9 and might affect the splicing. The splicing of the C>A sequence variation was analysed using a modified version of the EBD minigene construct. The results clearly indicate that the sequence change will not interfere with the splicing. The H558R polymorphism had significantly larger peak current amplitudes than wt-hH1. However, no difference in Na⁺ channel activation, inactivation, recovery of inactivation and levels of persistent sodium current had been observed between the wt and H558R clones.

Also in the present study a novel long QT form is characterized functionally. Andersen syndrome is a rare genetic multisystem disorder characterized by periodic paralysis, a cardiac phenotype and dysmorphic features. The N318S and W322C mutation clinically manifested only with a cardiac phenotype and without the dysmorphic features and periodic paralysis typical for AS. These results were correlated with the clinical phenotype.

These two mutations were the farthest C-terminal mutations reported in Kir2.1 and the amino acid Trp³²² is well conserved among Kir family members. According to the crystal structure of Kir2.1 the localization of these two mutations was very uncommon. Both mutations

represented no dominant negative effect and only a 20 % to 25 % current reduction when co-expressed with wild type. The minimal loss of channel function resulted from a deficient trafficking in case of W322C and a defect in gating for N318S. W322C displayed a perinuclear staining pattern residing in relatively large vesicular structures. Furthermore the mutations exhibited no dominante negative effects on Kir2.2 and Kir2.3 channels.

The findings support the notion, that a novel LQTS form is described and as such we propose, that these clinical and electrophysiological manifestations should be considered as a subtype of LQTS7.

Literaturverzeichnis

Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. 1999. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **97**: 175-87.

Abriel H, Kamynina E, Horisberger JD, Staub O. 2000. Regulation of the cardiac voltage-gated Na⁺ channel (H1) by the ubiquitin-protein ligase Ned4. *FEBS letters* **466**: 377-80.

Abriel H, Schläpfer J, Keller DI, Gavillet B, Buclin T, Biollaz J, Stoller R, Kappenberger L. 2004. Molecular and clinical determinants of drug-induced long QT syndrome: an iatrogenic channelopathy. *Swiss medical weekly : official journal of the Swiss Society of Infectious Diseases, the Swiss Society of Internal Medicine, the Swiss Society of Pneumology* **134**: 685-94.

Ackerman MJ, Porter CJ. 1998. Identification of a Family With Inherited Long QT Syndrome After a Pediatric Near-drowning. *Pediatrics* **101**: 306-308.

Ackerman MJ, Schroeder JJ, Berry R, Schaid DJ, Porter CJ, Michels VV, Thibodeau SN. 1998. A novel mutation in KVLQT1 is the molecular basis of inherited long QT syndrome in a near-drowning patient's family. *Pediatric research* **44**: 148-53.

Ackerman MJ, Tester DJ, Porter CJ. 1999. Swimming, a gene-specific arrhythmogenic trigger for inherited long QT syndrome. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* **74**: 1088-94.

Ai T, Fujiwara Y, Tsuji K, Otani H, Nakano S, Kubo Y, Horie M. 2002. Novel KCNJ2 mutation in familial periodic paralysis with ventricular dysrhythmia. *Circulation* **105**: 2592-4.

Albert CM, Nam EG, Rimm EB, Jin HW, Hajjar RJ, Hunter DJ, MacRae Ca, Ellinor PT. 2008. Cardiac sodium channel gene variants and sudden cardiac death in women. *Circulation* **117**: 16-23.

Albrecht DE, Froehner SC. 2002. Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neuro-Signals* **11**: 123-9.

Andelfinger G, Tapper AR, Welch RC, Vanoye CG, George AL, Benson DW. 2002. KCNJ2 mutation results in Andersen syndrome with sex-specific cardiac and skeletal muscle phenotypes. *American journal of human genetics* **71**: 663-8.

Andersen ED, Krasilnikoff PA, Overvad H. 1971. Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. A new syndrome? *Acta paediatrica Scandinavica* **60**: 559-64.

Antzelevitch C, Pollevick GD, Cordeiro JM, Casis O, Sanguinetti MC, Aizawa Y, Guerchicoff A, Pfeiffer R, Oliva A, Wollnik B, Gelber P, Bonaros EP, Burashnikov E, Wu Y, Sargent JD, Schickel S, Oberheiden R, Bhatia A, Hsu L, Haïssaguerre M, Schimpf R, Borggreffe M, Wolpert C. 2007. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation* **115**: 442-9.

Aydin A, Bähring S, Dahm S, Guenther UP, Uhlmann R, Busjahn A, Luft FC. 2005. Single nucleotide polymorphism map of five long-QT genes. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **83**: 159-65.

Baas F, Bikker H, van Ommen GJ, de Vijlder JJ. 1984. Unusual scarcity of restriction site polymorphism in the human thyroglobulin gene. A linkage study suggesting autosomal dominance of a defective thyroglobulin allele. *Human genetics* **67**: 301-5.

Ballester LY, Benson DW, Wong B, Law IH, Mathews KD, Vanoye CG, George AL. 2006. Trafficking-competent and trafficking-defective KCNJ2 mutations in Andersen syndrome. *Human mutation* **27**: 388.

- Baralle M. 2003.** Identification of a mutation that perturbs NF1 agene splicing using genomic DNA samples and a minigene assay. *Journal of Medical Genetics* **40**: 220-222.
- Baralle D, Lucassen A, Buratti E. 2009.** Missed threads. The impact of pre-mRNA splicing defects on clinical practice. *EMBO reports* **10**: 810-6.
- Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, Fink M, Lazdunski M, Romey G. 1996.** K(V)LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I(Ks) cardiac potassium current. *Nature* **384**: 78-80.
- Barry DM, Nerbonne JM. 1996.** Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annual review of physiology* **58**: 363-94.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. 1991.** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* **196**: 80-3.
- Belloq C, van Ginneken AC, Bezzina CR, Alders M, Escande D, Mannens MM, Baró I, Wilde AA. 2004.** Mutation in the KCNQ1 gene leading to the short QT-interval syndrome. *Circulation* **109**: 2394-7.
- Bendahhou S, Donaldson MR, Plaster NM, Tristani-Firouzi M, Fu Y, Ptáček LJ. 2003.** Defective potassium channel Kir2.1 trafficking underlies Andersen-Tawil syndrome. *The Journal of biological chemistry* **278**: 51779-85.
- Benjamin EJ, Rice KM, Arking DE, Pfeufer A, van Noord C, Smith AV, Schnabel RB, Bis JC, Boerwinkle E, Sinner MF, Dehghan A, Lubitz SA, D'Agostino RB, Lumley T, Ehret GB, Heeringa J, Aspelund T, Newton-Cheh C, Larson MG, Marcianti KD, Soliman EZ, Rivadeneira F, Wang TJ, Eiriksdottir G, Levy D, Psaty BM, Li M, Chamberlain AM, Hofman A, Vasani RS, Harris TB, Rotter JJ, Kao WH, Agarwal SK, Stricker BH, Wang K, Launer LJ, Smith NL, Chakravarti A, Uitterlinden AG, Wolf PA, Sotoodehnia N, Köttgen A, van Duijn CM, Meitinger T, Mueller M, Perz S, Steinbeck G, Wichmann H, Lunetta KL, Heckbert SR, Gudnason V, Alonso A, Kääb S, Ellinor PT, Witteman JC. 2009.** Variants in ZFHX3 are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry. *Nature genetics* **41**: 879-81.
- Bennett PB, Yazawa K, Makita N, George AL. 1995.** Molecular mechanism for an inherited cardiac arrhythmia. *Nature* **376**: 683-5.
- Benson DW, Wang DW, Dymant M, Knilans TK, Fish FA, Strieper MJ, Rhodes TH, George AL. 2003.** Congenital sick sinus syndrome caused by recessive mutations in the cardiac sodium channel gene (SCN5A). *The Journal of clinical investigation* **112**: 1019-28.
- Bezzina C, Veldkamp MW, van Den Berg MP, Postma AV, Rook MB, Viersma JW, van Langen IM, Tan-Sindhunata G, Bink-Boelkens MT, van Der Hout AH, Mannens MM, Wilde AA. 1999.** A single Na(+) channel mutation causing both long-QT and Brugada syndromes. *Circulation research* **85**: 1206-13.
- Bianchi L, Priori SG, Napolitano C, Surewicz Ka, Dennis aT, Memmi M, Schwartz PJ, Brown aM. 2000.** Mechanisms of I(Ks) suppression in LQT1 mutants. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **279**: H3003-11.
- Bichet D, Haass FA, Jan LY. 2003.** Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nature reviews. Neuroscience* **4**: 957-67.
- Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. 1999.** Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of molecular biology* **294**: 1351-62.
- Brugada P, Brugada J. 1992.** Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *Journal of the American College of Cardiology* **20**: 1391-6.

Brugada R, Hong K, Dumaine R, Cordeiro J, Gaita F, Borggrefe M, Menendez TM, Brugada J, Pollevick GD, Wolpert C, Burashnikov E, Matsuo K, Wu YS, Guerschicoff A, Bianchi F, Giustetto C, Schimpf R, Brugada P, Antzelevitch C. 2004. Sudden death associated with short-QT syndrome linked to mutations in HERG. *Circulation* **109**: 30-5.

Brugada R, Tapscott T, Czernuszewicz GZ, Marian AJ, Iglesias A, Mont L, Brugada J, Girona J, Domingo A, Bachinski LL, Roberts R. 1997. Identification of a genetic locus for familial atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* **336**: 905-11.

Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S. 1991. Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *Journal of molecular biology* **220**: 49-65.

Caputi M, Casari G, Guenzi S, Tagliabue R, Sidoli a, Melo Ca, Baralle FE. 1994. A novel bipartite splicing enhancer modulates the differential processing of the human fibronectin EDA exon. *Nucleic acids research* **22**: 1018-22.

Catterall WA. 2000. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**: 13-25.

Chen LY, Ballew JD, Herron KJ, Rodeheffer RJ, Olson TM. 2007. A common polymorphism in SCN5A is associated with lone atrial fibrillation. *Clinical pharmacology and therapeutics* **81**: 35-41.

Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, Brugada R, Brugada J, Brugada P, Potenza D, Moya a, Borggrefe M, Breithardt G, Ortiz-Lopez R, Wang Z, Antzelevitch C, O'Brien RE, Schulze-Bahr E, Keating MT, Towbin Ja, Wang Q. 1998. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature* **392**: 293-6.

Chen L, Marquardt ML, Tester DJ, Sampson KJ, Ackerman MJ, Kass RS. 2007. Mutation of an A-kinase-anchoring protein causes long-QT syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 20990-5.

Chen J, Xie X, Wang X, Tao M, Shang Y, Guo X. 2004. Single nucleotide polymorphisms of the SCN5A gene in Han Chinese and their relation with Brugada syndrome. *Chinese medical journal* **117**: 652-6.

Chen Y, Xu S, Bendahhou S, Wang X, Wang Y, Xu W, Jin H, Sun H, Su X, Zhuang Q, Yang Y, Li Y, Liu Y, Xu H, Li X, Ma N, Mou C, Chen Z, Barhanin J, Huang W. 2003. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science (New York, N.Y.)* **299**: 251-4.

Chen S, Zhang L, Bryant RM, Vincent GM, Flippin M, Lee JC, Brown E, Zimmerman F, Rozich R, Szafranski P, Oberti C, Sterba R, Marangi D, Tchou PJ, Chung MK, Wang Q. 2003. KCNQ1 mutations in patients with a family history of lethal cardiac arrhythmias and sudden death. *Clinical genetics* **63**: 273-82.

Choe C, Schulze-Bahr E, Neu A, Xu J, Zhu ZI, Sauter K, Bähring R, Priori S, Guicheney P, Mönnig G, Neapolitano C, Heidemann J, Clancy CE, Pongs O, Isbrandt D. 2006. C-terminal HERG (LQT2) mutations disrupt IKr channel regulation through 14-3-3epsilon. *Human molecular genetics* **15**: 2888-902.

Choi G, Kopplin LJ, Tester DJ, Will ML, Haglund CM, Ackerman MJ. 2004. Spectrum and frequency of cardiac channel defects in swimming-triggered arrhythmia syndromes. *Circulation* **110**: 2119-24.

Chouabe C, Neyroud N, Guicheney P, Lazdunski M, Romey G, Barhanin J. 1997. Properties of KvLQT1 K⁺ channel mutations in Romano-Ward and Jervell and Lange-Nielsen inherited cardiac arrhythmias. *The EMBO journal* **16**: 5472-9.

Chouabe C, Neyroud N, Richard P, Denjoy I, Hainque B, Romey G, Drici MD, Guicheney P, Barhanin J. 2000. Novel mutations in KvLQT1 that affect I_{Ks} activation through interactions with Isk. *Cardiovascular research* **45**: 971-80.

- Clancy CE, Tateyama M, Liu H, Wehrens XH, Kass RS. 2003.** Non-equilibrium gating in cardiac Na⁺ channels: an original mechanism of arrhythmia. *Circulation* **107**: 2233-7.
- Cole KS. 1979.** Mostly membranes (Kenneth S. Cole). *Annual review of physiology* **41**: 1-24.
- Creighton W, Virmani R, Kutys R, Burke A. 2006.** Identification of Novel Missense Mutations of Cardiac Ryanodine Receptor Gene in Exercise- Induced Sudden Death at Autopsy. *Circulation Research* **8**: 62-67.
- Curran ME, Splawski I, Timothy KW, Vincent GM, Green ED, Keating MT. 1995.** A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell* **80**: 795-803.
- Decher N, Renigunta V, Zuzarte M, Soom M, Heinemann SH, Timothy KW, Keating MT, Daut J, Sanguinetti MC, Splawski I. 2007.** Impaired interaction between the slide helix and the C-terminus of Kir2.1: a novel mechanism of Andersen syndrome. *Cardiovascular research* **75**: 748-57.
- Delisle BP, Anson BD, Rajamani S, January CT. 2004.** Biology of cardiac arrhythmias: ion channel protein trafficking. *Circulation research* **94**: 1418-28.
- Delpón E, Cordeiro JM, Núñez L, Thomsen PE, Guerchicoff A, Pollevick GD, Wu Y, Kanters JK, Larsen CT, Hofman-Bang J, Burashnikov E, Christiansen M, Antzelevitch C. 2008.** Functional effects of KCNE3 mutation and its role in the development of Brugada syndrome. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology* **1**: 209-18.
- Desmet F, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. 2009.** Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic acids research* **37**: e67.
- Dogan RI, Getoor L, Wilbur WJ, Mount SM. 2007.** SplicePort--an interactive splice-site analysis tool. *Nucleic acids research* **35**: W285-91.
- Donaldson MR, Jensen JL, Tristani-Firouzi M, Tawil R, Bendahhou S, Suarez Wa, Cobo aM, Poza JJ, Behr E, Wagstaff J, Szepietowski P, Pereira S, Mozaffar T, Escolar DM, Fu Y, Ptáček LJ. 2003.** PIP2 binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology* **60**: 1811-6.
- Doupnik CA, Davidson N, Lester HA. 1995.** The inward rectifier potassium channel family. *Current opinion in neurobiology* **5**: 268-77.
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R. 1998.** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science (New York, N.Y.)* **280**: 69-77.
- Ehrlich JR, Zicha S, Coutu P, Hébert TE, Nattel S. 2005.** Atrial fibrillation-associated minK38G/S polymorphism modulates delayed rectifier current and membrane localization. *Cardiovascular research* **67**: 520-8.
- Ellinor PT, Shin JT, Moore RK, Yoerger DM, MacRae CA. 2003.** Locus for atrial fibrillation maps to chromosome 6q14-16. *Circulation* **107**: 2880-3.
- Ellinor PT, Shin JT, Moore RK, Yoerger DM, MacRae Ca. 2003.** Locus for atrial fibrillation maps to chromosome 6q14-16. *Circulation* **107**: 2880-3.
- Franqueza L, Lin M, Shen J, Splawski I, Keating MT, Sanguinetti MC. 1999.** Long QT syndrome-associated mutations in the S4-S5 linker of KvLQT1 potassium channels modify gating and interaction with minK subunits. *The Journal of biological chemistry* **274**: 21063-70.
- Gaita F, Giustetto C, Bianchi F, Wolpert C, Schimpf R, Riccardi R, Grossi S, Richiardi E, Borggrefe M. 2003.** Short QT Syndrome: a familial cause of sudden death. *Circulation* **108**: 965-70.

Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. 1998. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**: 128-37.

Gellens ME, George aL, Chen LQ, Chahine M, Horn R, Barchi RL, Kallen RG. 1992. Primary structure and functional expression of the human cardiac tetrodotoxin-insensitive voltage-dependent sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 554-8.

Gluzman Y, Sambrook JF, Frisque RJ. 1980. Expression of early genes of origin-defective mutants of simian virus 40. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**: 3898-902.

Goldin AL. 2001. Resurgence of sodium channel research. *Annual review of physiology* **63**: 871-94.

Gouas L, Nicaud V, Berthet M, Forhan A, Tiret L, Balkau B, Guicheney P. 2005. Association of KCNQ1, KCNE1, KCNH2 and SCN5A polymorphisms with QTc interval length in a healthy population. *European journal of human genetics : EJHG* **13**: 1213-22.

Gould CM, Diella F, Via A, Puntervoll P, Gemünd C, Chabanis-Davidson S, Michael S, Sayadi A, Bryne JC, Chica C, Seiler M, Davey NE, Haslam N, Weatheritt RJ, Budd A, Hughes T, Pas J, Rychlewski L, Travé G, Aasland R, Helmer-Citterich M, Linding R, Gibson TJ. 2010. ELM: the status of the 2010 eukaryotic linear motif resource. *Nucleic acids research* **38**: D167-80.

Grant AO, Carboni MP, Neplioueva V, Starmer CF, Memmi M, Napolitano C, Priori S. 2002. Long QT syndrome, Brugada syndrome, and conduction system disease are linked to a single sodium channel mutation. *The Journal of clinical investigation* **110**: 1201-9.

Groenewegen WA, Firouzi M, Bezzina CR, Vliex S, van Langen IM, Sandkuijl L, Smits JP, Hulsbeek M, Rook MB, Jongsma HJ, Wilde AA. 2003. A cardiac sodium channel mutation cosegregates with a rare connexin40 genotype in familial atrial standstill. *Circulation research* **92**: 14-22.

Grompe M. 1993. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nature genetics* **5**: 111-7.

Gudbjartsson DF, Holm H, Gretarsdottir S, Thorleifsson G, Walters GB, Thorgeirsson G, Gulcher J, Mathiesen E, Nyrnes A, Wilsgaard T, Hald E, Hveem K. 2009. NIH Public Access. **41**: 876-878.

Guy HR, Seetharamulu P. 1986. Molecular model of the action potential sodium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**: 508-12.

Hodgson-Zingman DM, Karst ML, Zingman LV, Heublein DM, Darbar D, Herron KJ, Ballew JD, de Andrade M, Burnett JC, Olson TM. 2008. Atrial natriuretic peptide frameshift mutation in familial atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* **359**: 158-65.

Hong K, Bjerregaard P, Gussak I, Brugada R. 2005. Short QT syndrome and atrial fibrillation caused by mutation in KCNH2. *Journal of cardiovascular electrophysiology* **16**: 394-6.

Hosaka Y, Hanawa H, Washizuka T, Chinushi M, Yamashita F, Yoshida T, Komura S, Watanabe H, Aizawa Y. 2003. Function, subcellular localization and assembly of a novel mutation of KCNJ2 in Andersen's syndrome. *Journal of molecular and cellular cardiology* **35**: 409-15.

Hu D, Barajas-Martinez H, Burashnikov E, Springer M, Wu Y, Varro A, Pfeiffer R, Koopmann TT, Cordeiro JM, Guerchicoff A, Pollevick GD, Antzelevitch C. 2009. A mutation in the beta 3 subunit of the cardiac sodium channel associated with Brugada ECG phenotype. *Circulation. Cardiovascular genetics* **2**: 270-8.

Huang F, Chen J, Lin M, Keating MT, Sanguinetti MC. 2001. Long-QT Syndrome-Associated Missense Mutations in the Pore Helix of the HERG Potassium Channel. *Circulation* **104**: 1071-1075.

Huang CL, Feng S, Hilgemann DW. 1998. Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP2 and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* **391**: 803-6.

Iwasa H, Itoh T, Nagai R, Nakamura Y, Tanaka T. 2000. Twenty single nucleotide polymorphisms (SNPs) and their allelic frequencies in four genes that are responsible for familial long QT syndrome in the Japanese population. *Journal of human genetics* **45**: 182-3.

Jervell A, Lange-Nielsen F. 1957. Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *American heart journal* **54**: 59-68.

Kagan A, Melman YF, Krumerman A, McDonald TV. 2002. 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K⁺ channel activity. *The EMBO journal* **21**: 1889-98.

Kass RS. 2006. Sodium Channel Inactivation in Heart : A Novel Role of the Carboxy-Terminal Domain. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*: 21-25.

Kenyon JL, Gibbons WR. 1979. Influence of chloride, potassium, and tetraethylammonium on the early outward current of sheep cardiac Purkinje fibers. *The Journal of general physiology* **73**: 117-38.

Kiehn J, Thomas D, Karle CA, Schöls W, Kübler W. 1999. Inhibitory effects of the class III antiarrhythmic drug amiodarone on cloned HERG potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **359**: 212-9.

Kim J, Ghosh S, Liu H, Tateyama M, Kass RS, Pitt GS. 2004. Calmodulin mediates Ca²⁺ sensitivity of sodium channels. *The Journal of biological chemistry* **279**: 45004-12.

Kirchhof P, Eckardt L, Franz MR, Mönnig G, Loh P, Wedekind H, Schulze-Bahr E, Breithardt G, Haverkamp W. 2003. Prolonged atrial action potential durations and polymorphic atrial tachyarrhythmias in patients with long QT syndrome. *Journal of cardiovascular electrophysiology* **14**: 1027-33.

Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Lowe ED, Zimmer J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA. 2003. Crystal Structure of the the Closed State. *Science* **300**: 1922-1926.

Lai L, Su M, Yeh H, Lin J, Chiang F, Hwang J, Hsu K, Tseng C, Lien W, Tseng Y. 2002. Association of the human minK gene 38G allele with atrial fibrillation: Evidence of possible genetic control on the pathogenesis of atrial fibrillation. *American Heart Journal* **144**: 485-490.

Liu GX, Derst C, Schlichthörl G, Heinen S, Seeböhm G, Brüggemann a, Kummer W, Veh RW, Daut J, Preisig-Müller R. 2001. Comparison of cloned Kir2 channels with native inward rectifier K⁺ channels from guinea-pig cardiomyocytes. *The Journal of physiology* **532**: 115-26.

Lizotte E, Junttila MJ, Dube MP, Hong K, Benito B, DE Zutter M, Henkens S, Sarkozy A, Huikuri HV, Towbin J, Vatta M, Brugada P, Brugada J, Brugada R. 2009. Genetic modulation of brugada syndrome by a common polymorphism. *Journal of cardiovascular electrophysiology* **20**: 1137-41.

London B, Michalec M, Mehdi H, Zhu X, Kerchner L, Sanyal S, Viswanathan PC, Pfahnl AE, Shang LL, Madhusudanan M, Baty CJ, Lagana S, Aleong R, Gutmann R, Ackerman MJ, McNamara DM, Weiss R, Dudley SC. 2007. Mutation in glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 like gene (GPD1-L) decreases cardiac Na⁺ current and causes inherited arrhythmias. *Circulation* **116**: 2260-8.

Lopatin AN, Makhina EN, Nichols CG. 1994. Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* **372**: 366-9.

Lopes CM, Zhang H, Rohacs T, Jin T, Yang J, Logothetis DE. 2002. Alterations in conserved Kir channel-PIP2 interactions underlie channelopathies. *Neuron* **34**: 933-44.

- Loussouarn G, Park K, Bellocq C, Baró I, Charpentier F, Escande D. 2003.** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, PIP₂, controls KCNQ1/KCNE1 voltage-gated potassium channels: a functional homology between voltage-gated and inward rectifier K⁺ channels. *The EMBO journal* **22**: 5412-21.
- MacKinnon R. 1991.** Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature* **350**: 232-5.
- Makielski JC, Ye B, Valdivia CR, Pagel MD, Pu J, Tester DJ, Ackerman MJ. 2003.** A ubiquitous splice variant and a common polymorphism affect heterologous expression of recombinant human SCN5A heart sodium channels. *Circulation research* **93**: 821-8.
- Makita N, Horie M, Nakamura T, Ai T, Sasaki K, Yokoi H, Sakurai M, Sakuma I, Otani H, Sawa H, Kitabatake A. 2002.** Drug-induced long-QT syndrome associated with a subclinical SCN5A mutation. *Circulation* **106**: 1269-74.
- Medeiros-Domingo A, Kaku T, Tester DJ, Iturralde-Torres P, Itty A, Ye B, Valdivia C, Ueda K, Canizales-Quinteros S, Tusié-Luna MT, Makielski JC, Ackerman MJ. 2007.** SCN4B-encoded sodium channel beta4 subunit in congenital long-QT syndrome. *Circulation* **116**: 134-42.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* **16**: 1215.
- Mitcheson JS, Sanguinetti MC. 1999.** Biophysical properties and molecular basis of cardiac rapid and slow delayed rectifier potassium channels. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **9**: 201-16.
- Mohler P, Schott J, Gramolini A, Dilly K, S. 2003.** Ankyrin-B mutation causes type 4 long-QT cardiac arrhythmia and sudden cardiac death. *Nature* **421**: 1-6.
- Morais Cabral JH, Lee A, Cohen SL, Chait BT, Li M, Mackinnon R. 1998.** Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. *Cell* **95**: 649-55.
- Moss AJ, Robinson JL, Gessman L, Gillespie R, Zareba W, Schwartz PJ, Vincent GM, Benhorin J, Heilbron EL, Towbin JA, Priori SG, Napolitano C, Zhang L, Medina A, Andrews ML, Timothy K. 1999.** Comparison of clinical and genetic variables of cardiac events associated with loud noise versus swimming among subjects with the long QT syndrome. *The American journal of cardiology* **84**: 876-9.
- Moss AJ, Schwartz PJ, Crampton RS, Tzivoni D, Locati EH, MacCluer J, Hall WJ, Weiskamp L, Vincent GM, Garson A. 1991.** The long QT syndrome. Prospective longitudinal study of 328 families. *Circulation* **84**: 1136-44.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **51 Pt 1**: 263-73.
- Muro AF, Caputi M, Pariyarath R, Pagani F, Buratti E, Baralle FE. 1999.** Regulation of fibronectin EDA exon alternative splicing: possible role of RNA secondary structure for enhancer display. *Molecular and cellular biology* **19**: 2657-71.
- Murray A, Potet F, Bellocq C, Reardon W, Hughes HE, Jeffery S. 2002.** Mutation in KCNQ1 that has both recessive and dominant characteristics. *October*.
- Nakamura TY, Artman M, Rudy B, Coetzee Wa. 1998.** Inhibition of rat ventricular IK1 with antisense oligonucleotides targeted to Kir2.1 mRNA. *The American journal of physiology* **274**: H892-900.
- Napolitano C, Priori SG, Schwartz PJ, Bloise R, Ronchetti E, Nastoli J, Bottelli G, Cerrone M, Leonardi S. 2005.** Genetic testing in the long QT syndrome: development and validation of an efficient approach to genotyping in clinical practice. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **294**: 2975-80.

- Neyroud N, Tesson F, Denjoy I, Leibovici M, Donger C, Barhanin J, Fauré S, Gary F, Coumel P, Petit C, Schwartz K, Guicheney P. 1997. A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT1 causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome. *Nature genetics* **15**: 186-9.
- Noble D, Tsien RW. 1969. Outward membrane currents activated in the plateau range of potentials in cardiac Purkinje fibres. *The Journal of physiology* **200**: 205-31.
- Olson TM, Alekseev AE, Liu XK, Park S, Zingman LV, Bienengraeber M, Sattiraju S, Ballew JD, Jahangir A, Terzic A. 2006. Kv1.5 channelopathy due to KCNA5 loss-of-function mutation causes human atrial fibrillation. *Human molecular genetics* **15**: 2185-91.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**: 2766-70.
- Padgett Ra, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp Pa. 1986. Splicing of messenger RNA precursors. *Annual review of biochemistry* **55**: 1119-50.
- Pagani F, Buratti E, Stuani C, Romano M, Zuccato E, Niksic M, Giglio L, Faraguna D, Baralle FE. 2000. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. *The Journal of biological chemistry* **275**: 21041-7.
- Panaghié G, Tai K, Abbott GW. 2006. Interaction of KCNE subunits with the KCNQ1 K⁺ channel pore. *The Journal of physiology* **570**: 455-67.
- Pegan S, Arrabit C, Zhou W, Kwiatkowski W, Collins A, Slesinger Pa, Choe S. 2005. Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nature neuroscience* **8**: 279-87.
- Phelan MC. 2006. Techniques for mammalian cell tissue culture. *Current protocols in cytometry / editorial board, J. Appendix 3*: Appendix 3B.
- Pietilä E, Fodstad H, Niskasaari E, Laitinen P PJ, Swan H, Savolainen M, Kesäniemi YA, Kontula K, Huikuri HV. 2002. Association between HERG K897T polymorphism and QT interval in middle-aged Finnish women. *Journal of the American College of Cardiology* **40**: 511-4.
- Plant LD, Rajan S, Goldstein SA. 2005. K2P channels and their protein partners. *Current opinion in neurobiology* **15**: 326-33.
- Plaster NM, Tawil R, Tristani-Firouzi M, Canún S, Bendahhou S, Tsunoda A, Donaldson MR, Iannaccone ST, Brunt E, Barohn R. 2001. Mutations in Kir2.1 Cause the Developmental and Episodic Electrical Phenotypes of Andersen's Syndrome. *Cell* **105**: 511-519.
- Potet F, Scott JD, Mohammad-Panah R, Escande D, Baró I. 2001. AKAP proteins anchor cAMP-dependent protein kinase to KvLQT1/IsK channel complex. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **280**: H2038-45.
- Preisig-Müller R, Schlichthörl G, Goerge T, Heinen S, Brüggemann A, Rajan S, Derst C, Veh RW, Daut J. 2002. Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 7774-9.
- Priori SG, Pandit SV, Rivolta I, Berenfeld O, Ronchetti E, Dhamoon A, Napolitano C, Anumonwo J, di Barletta MR, Gudapakkam S, Bosi G, Stramba-Badiale M, Jalife J. 2005. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circulation research* **96**: 800-7.
- Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bianchi L, Dennis A, De Fusco M, Brown AM, Casari G. 1998. A recessive variant of the Romano-Ward long-QT syndrome? *Circulation* **97**: 2420-5.

- Priori SG, Schwartz PJ, Napolitano C, Bloise R, Ronchetti E, Grillo M, Vicentini A, Spazzolini C, Nastoli J, Bottelli G, Folli R, Cappelletti D. 2003. Risk stratification in the long-QT syndrome. *The New England journal of medicine* **348**: 1866-74.
- Puntervoll P. 2003. ELM server: a new resource for investigating short functional sites in modular eukaryotic proteins. *Nucleic Acids Research* **31**: 3625-3630.
- Raab-Graham KF, Radeke CM, Vandenberg CA. 1994. Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport* **5**: 2501-5.
- Reardon W, Lewis N, Hughes HE. 1993. Consanguinity, cardiac arrest, hearing impairment, and ECG abnormalities: counselling pitfalls in the Romano-Ward syndrome. *Journal of medical genetics* **30**: 325-7.
- Rittinger K, Budman J, Xu J, Volinia S, Cantley LC, Smerdon SJ, Gamblin SJ, Yaffe MB. 1999. Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Molecular cell* **4**: 153-66.
- Rivolta I, Abriel H, Tateyama M, Liu H, Memmi M, Vardas P, Napolitano C, Priori SG, Kass RS. 2001. Inherited Brugada and long QT-3 syndrome mutations of a single residue of the cardiac sodium channel confer distinct channel and clinical phenotypes. *The Journal of biological chemistry* **276**: 30623-30.
- Roden DM. 1998. Taking the "idio" out of "idiosyncratic": predicting torsades de pointes. *Pacing and clinical electrophysiology : PACE* **21**: 1029-34.
- Roden DM, Balser JR, George AL, Anderson ME. 2002. Cardiac ion channels. *Annual review of physiology* **64**: 431-75.
- Rohács T, Chen J, Prestwich GD, Logothetis DE. 1999. Distinct specificities of inwardly rectifying K(+) channels for phosphoinositides. *The Journal of biological chemistry* **274**: 36065-72.
- Romano C, Gemme G, Pongiglione R. 1963. Rare cardiac arrhythmias of the pediatric age. II. Syncopal attacks due to paroxysmal ventricular fibrillation. *La Clinica pediatrica* **45**: 656-83.
- Ruan Y, Liu N, Bloise R, Napolitano C, Priori SG. 2007. Gating properties of SCN5A mutations and the response to mexiletine in long-QT syndrome type 3 patients. *Circulation* **116**: 1137-44.
- Sanguinetti MC, Jurkiewicz NK. 1990. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *The Journal of general physiology* **96**: 195-215.
- Sanguinetti MC, Curran ME, Zou A, Shen J, Spector PS, Atkinson DL, Keating MT. 1996. Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel. *Nature* **384**: 80-3.
- Sanguinetti MC, Jiang C, Curran ME, Keating MT. 1995. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel. *Cell* **81**: 299-307.
- Schmitt N, Schwarz M, Peretz A, Abitbol I, Attali B, Pongs O. 2000. A recessive C-terminal Jervell and Lange-Nielsen mutation of the KCNQ1 channel impairs subunit assembly. *The EMBO journal* **19**: 332-40.
- Schott JJ, Charpentier F, Peltier S, Foley P, Drouin E, Bouhour JB, Donnelly P, Vergnaud G, Bachner L, Moisan JP. 1995. Mapping of a gene for long QT syndrome to chromosome 4q25-27. *American journal of human genetics* **57**: 1114-22.
- Schulze-Bahr E, Neu A, Friederich P, Kaupp UB, Breithardt G, Pongs O, Isbrandt D. 2003. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *The Journal of clinical investigation* **111**: 1537-45.
- Schulze-Bahr E, Wedekind H, Haverkamp W, Borggreffe M, Assmann G, Breithardt G, Funke H. 1999. The LQT syndromes--current status of molecular mechanisms. *Zeitschrift für Kardiologie* **88**: 245-54.

Schwartz PJ, Periti M, Malliani A. 1975. The long Q-T syndrome. *American heart journal* **89**: 378-90.

Schwartz PJ, Priori SG, Spazzolini C, Moss AJ, Vincent GM, Napolitano C, Denjoy I, Guicheney P, Breithardt G, Keating MT, Towbin JA, Beggs AH, Brink P, Wilde AA, Toivonen L, Zareba W, Robinson JL, Timothy KW, Corfield V, Wattanasirichaigoon D, Corbett C, Haverkamp W, Schulze-Bahr E, Lehmann MH, Schwartz K, Coumel P, Bloise R. 2001. Genotype-phenotype correlation in the long-QT syndrome: gene-specific triggers for life-threatening arrhythmias. *Circulation* **103**: 89-95.

Shalaby FY, Levesque PC, Yang WP, Little WA, Conder ML, Jenkins-West T, Blannar MA. 1997. Dominant-negative KvLQT1 mutations underlie the LQT1 form of long QT syndrome. *Circulation* **96**: 1733-6.

Smith JA, Vanoye CG, George AL, Meiler J, Sanders CR. 2007. Structural models for the KCNQ1 voltage-gated potassium channel. *Biochemistry* **46**: 14141-52.

Snyders DJ. 1999. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovascular research* **42**: 377-90.

Splawski I, Shen J, Timothy KW, Lehmann MH, Priori S, Robinson JL, Moss aJ, Schwartz PJ, Towbin Ja, Vincent GM, Keating MT. 2000. Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* **102**: 1178-85.

Splawski I, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, Lehmann MH, Keating MT. 1998. Genomic structure of three long QT syndrome genes: KVLQT1, HERG, and KCNE1. *Genomics* **51**: 86-97.

Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT. 2004. Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* **119**: 19-31.

Splawski I, Tristani-Firouzi M, Lehmann MH, Sanguinetti MC, Keating MT. 1997. Mutations in the hminK gene cause long QT syndrome and suppress IKs function. *Nature genetics* **17**: 338-40.

Stühmer W. 1992. Electrophysiological recording from *Xenopus* oocytes. *Methods in enzymology* **207**: 319-39.

Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, Kubo H, Numa S. 1989. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. *Nature* **339**: 597-603.

Takahata T, Yasui-Furukori N, Sasaki S, Igarashi T, Okumura K, Munakata A, Tateishi T. 2003. Nucleotide changes in the translated region of SCN5A from Japanese patients with Brugada syndrome and control subjects. *Life sciences* **72**: 2391-9.

Tan HL, Bink-Boelkens MT, Bezzina CR, Viswanathan PC, Beaufort-Krol GC, van Tintelen PJ, van den Berg MP, Wilde aa, Balser JR. 2001. A sodium-channel mutation causes isolated cardiac conduction disease. *Nature* **409**: 1043-7.

Tan HL, Kupersmidt S, Zhang R, Stepanovic S, Roden DM, Wilde AA, Anderson ME, Balser JR. 2002. A calcium sensor in the sodium channel modulates cardiac excitability. *Nature* **415**: 442-7.

Tapper A, R, George AL. 2001. Location and orientation of minK within the I(Ks) potassium channel complex. *The Journal of biological chemistry* **276**: 38249-54.

Tawil R, Ptacek LJ, Pavlakis SG, DeVivo DC, Penn AS, Ozdemir C, Griggs RC. 1994. Andersen's syndrome: potassium-sensitive periodic paralysis, ventricular ectopy, and dysmorphic features. *Annals of neurology* **35**: 326-30.

Terrenoire C, Clancy CE, Cormier JW, Sampson KJ, Kass RS. 2005. Autonomic control of cardiac action potentials: role of potassium channel kinetics in response to sympathetic stimulation. *Circulation research* **96**: e25-34.

Thomas D, Zhang W, Karle Ca, Kathöfer S, Schöls W, Kübler W, Kiehn J. 1999. Deletion of protein kinase A phosphorylation sites in the HERG potassium channel inhibits activation shift by protein kinase A. *The Journal of biological chemistry* **274**: 27457-62.

Tristani-Firouzi M, Chen J, Mitcheson JS, Sanguinetti MC. 2001. Molecular biology of K(+) channels and their role in cardiac arrhythmias. *The American journal of medicine* **110**: 50-9.

Tristani-Firouzi M, Jensen JL, Donaldson MR, Sansone V, Meola G, Hahn A, Bendahhou S, Kwiecinski H, Fidzianska A, Plaster N, Fu Y, Ptacek LJ, Tawil R. 2002. Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *The Journal of clinical investigation* **110**: 381-8.

Trudeau MC, Warmke JW, Ganetzky B, Robertson GA. 1995. HERG, a human inward rectifier in the voltage-gated potassium channel family. *Science (New York, N.Y.)* **269**: 92-5.

Tyson J, Tranebjaerg L, Bellman S, Wren C, Taylor JF, Bathen J, Aslaksen B, Sørland SJ, Lund O, Malcolm S, Pembrey M, Bhattacharya S, Bitner-Glindzicz M. 1997. IsK and KvLQT1: mutation in either of the two subunits of the slow component of the delayed rectifier potassium channel can cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Human molecular genetics* **6**: 2179-85.

Tzivion G, Avruch J. 2002. 14-3-3 Proteins: Active Cofactors in Cellular Regulation By Serine/Threonine Phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **277**: 3061-4.

Ueda K, Valdivia C, Medeiros-Domingo A, Tester DJ, Vatta M, Farrugia G, Ackerman MJ, Makielski JC. 2008. Syntrophin mutation associated with long QT syndrome through activation of the nNOS-SCN5A macromolecular complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 9355-60.

Ulbricht W. 2005. Sodium Channel Inactivation : Molecular Determinants and Modulation. *Physiological Reviews*: 1271-1301.

Vatta M, O, Ackerman MJ, Ye B, Makielski JC, Ughanze EE, Taylor EW, Tester DJ, Balijepalli RC, Foell JD, Li Z, Kamp TJ, Towbin JA. 2006. Mutant caveolin-3 induces persistent late sodium current and is associated with long-QT syndrome. *Circulation* **114**: 2104-12.

Vetter DE, Mann JR, Wangemann P, Liu J, McLaughlin KJ, Lesage F, Marcus DC, Lazdunski M, Heinemann SF, Barhanin J. 1996. Inner ear defects induced by null mutation of the isk gene. *Neuron* **17**: 1251-64.

Viswanathan PC, Benson DW, Balser JR. 2003. A common SCN5A polymorphism modulates the biophysical effects of an SCN5A mutation. *Journal of Clinical Investigation* **111**: 341-346.

Wang Q, Curran ME, Splawski I, Burn TC, Millholland JM, VanRaay TJ, Shen J, Timothy KW, Vincent GM, de Jager T, Schwartz PJ, Toubin JA, Moss AJ, Atkinson DL, Landes GM, Connors TD, Keating MT. 1996. Positional cloning of a novel potassium channel gene: KVLQT1 mutations cause cardiac arrhythmias. *Nature genetics* **12**: 17-23.

Wang Q, Li Z, Shen J, Keating MT. 1996. Genomic organization of the human SCN5A gene encoding the cardiac sodium channel. *Genomics* **34**: 9-16.

Wang Q, Shen J, Splawski I, Atkinson D, Li Z, Robinson JL, Moss AJ, Towbin JA, Keating MT. 1995. SCN5A mutations associated with an inherited cardiac arrhythmia, long QT syndrome. *Cell* **80**: 805-11.

Wang Z, Tristani-Firouzi M, Xu Q, Lin M, Keating MT, Sanguinetti MC. 1999. Functional effects of mutations in KvLQT1 that cause long QT syndrome. *Journal of cardiovascular electrophysiology* **10**: 817-26.

Wang Z, Yue L, White M, Pelletier G, Nattel S. 1998. Differential distribution of inward rectifier potassium channel transcripts in human atrium versus ventricle. *Circulation* **98**: 2422-8.

- Ward OC. 1964.** A new familial cardiac syndrome in children. *Journal of the Irish Medical Association* **54**: 103-6.
- Ward. 1964.** A new familial cardiac syndrome in children. *Journal of the Irish Medical Association* **54**: 103-6.
- Warmke JW, Ganetzky B. 1994.** A family of potassium channel genes related to eag in Drosophila and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 3438-42.
- Warmke J, Drysdale R, Ganetzky B. 1991.** A distinct potassium channel polypeptide encoded by the Drosophila eag locus. *Science (New York, N.Y.)* **252**: 1560-2.
- Watanabe H, Koopmann TT, Le Scouarnec S, Yang T, Ingram CR, Schott J, Demolombe S, Probst V, Anselme F, Escande D, Wiesel AC, Pfeufer A, Kääh S, Wichmann H, Hasdemir C, Aizawa Y, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR. 2008.** Sodium channel beta1 subunit mutations associated with Brugada syndrome and cardiac conduction disease in humans. *The Journal of clinical investigation* **118**: 2260-8.
- Weidemann S. 1951.** Effect of current flow on the membrane potential of cardiac muscle. *The Journal of physiology* **115**: 227-36.
- Weiss KM, Clark AG. 2002.** Linkage disequilibrium and the mapping of complex human traits. *Trends in genetics : TIG* **18**: 19-24.
- Westermann M, Steiniger F, Richter W. 2005.** Belt-like localisation of caveolin in deep caveolae and its redistribution after cholesterol depletion. *Histochemistry and cell biology* **123**: 613-20.
- Wible BA, De Biasi M, Majumder K, Taglialatela M, Brown AM. 1995.** Cloning and functional expression of an inwardly rectifying K⁺ channel from human atrium. *Circulation research* **76**: 343-50.
- Wilson AJ, Quinn KV, Graves FM, Bitner-Glindzicz M, Tinker A. 2005.** Abnormal KCNQ1 trafficking influences disease pathogenesis in hereditary long QT syndromes (LQT1). *Cardiovascular research* **67**: 476-86.
- Wollnik B, Schroeder BC, Kubisch C, Esperer HD, Wieacker P, Jentsch TJ. 1997.** Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive KVLQT1 K⁺ channel mutations found in inherited cardiac arrhythmias. *Human molecular genetics* **6**: 1943-9.
- Xia M, Jin Q, Bendahhou S, He Y, Larroque M, Chen Y, Zhou Q, Yang Y, Liu Y, Liu B, Zhu Q, Zhou Y, Lin J, Liang B, Li L, Dong X, Pan Z, Wang R, Wan H, Qiu W, Xu W, Eurlings P, Barhanin J, Chen Y. 2005.** A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochemical and biophysical research communications* **332**: 1012-9.
- Xiao B, Smerdon SJ, Jones DH, Dodson GG, Soneji Y, Aitken A, Gamblin SJ. 1995.** Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature* **376**: 188-91.
- Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, Caron PR, Aitken A, Leffers H, Gamblin SJ, Smerdon SJ, Cantley LC, Street W. 1997.** for 14-3-3 : Phosphopeptide Binding Specificity. *Cell* **91**: 961-971.
- Yang N, Horn R. 1995.** Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels. *Neuron* **15**: 213-8.
- Yang J, Jan YN, Jan LY. 1995.** Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* **15**: 1441-7.
- Yang P, Kanki H, Drolet B, Yang T, Wei J, Viswanathan PC, Hohnloser SH, Shimizu W, Schwartz PJ, Stanton M, Murray KT, Norris K, George AL, Roden DM. 2002.** Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. *Circulation* **105**: 1943-8.

Yang P, Koopmann TT, Pfeufer A, Jalilzadeh S, Schulze-Bahr E, Kääh S, Wilde AA, Roden DM, Bezzina CR. 2008. Polymorphisms in the cardiac sodium channel promoter displaying variant in vitro expression activity. *European journal of human genetics : EJHG* **16**: 350-7.

Yang Y, Xia M, Jin Q, Bendahhou S, Shi J, Chen Y, Liang B, Lin J, Liu Y, Liu B, Zhou Q, Zhang D, Wang R, Ma N, Su X, Niu K, Pei Y, Xu W, Chen Z, Wan H, Cui J, Barhanin J, Chen Y. 2004. Identification of a KCNE2 gain-of-function mutation in patients with familial atrial fibrillation. *American journal of human genetics* **75**: 899-905.

Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. 1999. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* **22**: 537-48.

Zhang H, He C, Yan X, Mirshahi T, Logothetis DE. 1999. Activation of inwardly rectifying K⁺ channels by distinct PtdIns(4,5)P₂ interactions. *Nature cell biology* **1**: 183-8.

Zhang L, Vincent GM, Baralle M, Baralle FE, Anson BD, Benson DW, Whiting B, Timothy KW, Carlquist J, January CT, Keating MT, Splawski I. 2004. An intronic mutation causes long QT syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* **44**: 1283-91.

Zuzarte M, Rinné S, Schlichthörl G, Schubert A, Daut J, Preisig-Müller R. 2007. A di-acidic sequence motif enhances the surface expression of the potassium channel TASK-3. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* **8**: 1093-100.

van den Berg MP, Wilde AA, Viersma TJW, Brouwer J, Haaksma J, van Der Hout AH, Stolte-Dijkstra I, Bezzina TCR, Van Langen IM, Beaufort-Krol GC, Cornel JH, Crijns HJ. 2001. Possible bradycardic mode of death and successful pacemaker treatment in a large family with features of long QT syndrome type 3 and Brugada syndrome. *Journal of cardiovascular electrophysiology* **12**: 630-6.

Danksagung

An dieser Stelle meiner Doktorarbeit möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Niels Decher, der es mir ermöglicht und mich stets dabei unterstützt hat, in der AG Vegetative Physiologie der Philipps-Universität Marburg wissenschaftlich zu arbeiten und zu promovieren. Auch möchte ich ihm für die Begutachtung dieser Arbeit danken.

Außerdem möchte ich mich bei allen Arbeitskollegen für das tolle Arbeitsklima, die fortwährend freundliche, zuvorkommende und äußerst kollegiale Art und den gemeinsamen Spaß im Labor bedanken. Besonders gilt mein Dank Anne-Kathrin Streit und Magdalena Walecki für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Grimm möchte ich für die Hilfe bei der Patientenauswahl danken.

Besonders möchte ich Herrn Prof. Dr. Schulze-Bahr für die Bereitstellung der im Kir2.1-Kanal identifizierten N318S- und W322C-Mutation danken.

Ein großer Dank geht an meine Eltern und Elisabeth, die ein großes Interesse für meine Arbeit gezeigt und mir während meiner gesamten akademischen Ausbildung immer zur Seite gestanden haben.

Zum Schluss möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Mann bedanken. Ohne ihn hätte ich es nie geschafft. Danke.

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg:

Decher

Meine akademischen Lehrer waren in Osnabrück:

Altendorf

Bakker

Bakker

Decker-Hebestreit

Eggers

Engelbrecht-Vandre

Heinisch

Hurka

Junge

Kratochwil

Krüppel

Lipski

Purschke

Reuter

Rosemeyer

Scheibe

Scholze

Schrempf

Wagner

Wieczorek

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Maren Limberg, geboren am 03.05.1983 in Emden ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Genetische Ursachen des Longen-QT-Syndroms“ ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen, als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg,

Datum:

Unterschrift:.....

Anhang

PCR Laufprofil 1:

3 min	95 °C	
40 sec	95 °C	} 30-42 x
40 sec	x °C	
60 sec	72 °C	
5 min	72 °C	
∞	10 °C	

PCR Laufprofil 2:

3 min	94 °C	
10 sec	94 °C	} 30-42 x
20 sec	x °C	
20 sec	72 °C	
5 min	72 °C	
∞	10 °C	

PCR Laufprofil 3:

5 min	95 °C	
40 sec	95 °C	} 30-42 x
40 sec	x °C	
90 sec	72 °C	
5 min	72 °C	
∞	10 °C	

PCR Laufprofil 4 (Touchdown- PCR):

3 min	95 °C	
40 sec	95 °C	} 20 x, 0.5 °C ↓
40 sec	x ₁ °C- x ₂ °C	
60 sec	72 °C	
40 sec	95 °C	} 26 x
40 sec	x ₃ °C	
60 sec	72 °C	
5 min	72 °C	
∞	10 °C	

PCR Laufprofil 5 (Touchdown- PCR):

3 min	95 °C	
40 sec	95 °C	} 10 x, 1 °C ↓
40 sec	x ₁ °C- x ₂ °C	
60 sec	72 °C	
40 sec	95 °C	} 36 x
40 sec	x ₃ °C	
60 sec	72 °C	
5 min	72 °C	
∞	10 °C	

PCR Laufprofil 6:

3 min	94 °C	
10 sec	94 °C	} 5 x
20 sec	x ₁ °C	
20 sec	72 °C	
10 sec	94 °C	} 30-35 x
20 sec	x ₂ °C	
20 sec	72 °C	
5 min	72 °C	
∞	10 °C	

PCR Laufprofil 7:

5 min	95 °C	
10 sec	95 °C	} 30-42 x
20 sec	x °C	
20 sec	72 °C	
3 min	72 °C	
∞	10 °C	

PCR Laufprofil 8:

5 min	95 °C	
60 sec	95 °C	} 30-42 x
40 sec	x °C	
90 sec	72 °C	
3 min	72 °C	
∞	10 °C	

Tabelle 5.1.3-1: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse der akzessorischen Untereinheit KChIP2

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
1-I	135	F	ACTTCTGCTTTAGGGGCAGATT	295	LP 1, x = 52 °C; 33 Zyklen; 5 % DMSO; 1µM Primer	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	136	R	GTCTGAGGTCTACCCGGAGGT			
1-II	221	F	CTCTGCGCTCACCTGCTG	249	LP 1, x = 57 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO; 3 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	222	R	ATCGGACAACTCTCCTTGC			
2-I	141	F	CTCCAGGGTTTCGATCCTATG	275	LP 1, x = 50 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	142	R	CTTCGCTCACTTTTTGAAGGAT			
3-I	143	F	AACAGAGGGACAATGGGAGTT	219	LP 1, x = 56 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	144	R	ACACACTCATGCACAGACACG			
4-I	145	F	CGAGAGTGTGGGTGTGACC	214	LP 1, x = 65 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	146	R	CCATCCTCTACACCTGTCACC			
5-I	229	F	TTTCGTGTGTGTCTGTGCTG	250	-	
	230	R	ACCCCAAGATGGCAAAGC			
6-I	149	F	AATGGGGCAGTGATTGAAG	272	LP 1, x = 57 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	150	R	CTTTCTGGGAAGCTGTGGAC			
7-I	151	F	GCCCTGAGACTGAACTTCTAGC	231	LP 1, x = 52 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	152	R	AGACAAAATCCCCTTCCGTTC			
8-I	153	F	TCTGGAGGCTTGAAGATTATCC	248	LP 1, x = 50 °C; 38 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	154	R	AGAATCCCCTCCCTCCCTCAG			
8-I	327	F	AAGAAGTCTTCCCTCCCATCA	279	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	328	R	CTCCCTCAGCCTAGAGAAGGA			
9-I	155	F	AGCTCCTTAGAGGGAGGAAGTC	233	LP 1, x = 57 °C; 40 Zyklen; 8 % DMSO; 1µM Primer	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	156	R	GGGTACTCTTCACCCAACCTCCT			
10-I	225	F	GCCAAACCCAGAGAAGGAGT	287	-	
	226	R	TCCCTTGATCCCTTGCTTGT			
11-I	159	F	ACATATGCCCACAAGCAAGG	250	LP 1, x = 55 °C; 33 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	160	R	AGTTCCCTGCTGGTTCTTGG			
12-I	161	F	ACCTGACTTCTGTCTGCCTCTC	250	LP 1, x = 52 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	162	R	TAGGATTGAAATATGGGGGTGA			
13-I	163	F	GCTCCTTCTCTTCTCTCTTCA	247	LP 1, x = 54 °C; 33 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	164	R	GACTACTGAATCCCCAAGCTCT			
13-II	165	F	CTAGTCCAGGCGGACCTCAC	297	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	166	R	GAAGCACCATAGCAGGAGACAT			
13-III	167	F	CAACTCCCACCAGCTCTCAC	293	LP 1, x = 55 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	168	R	ATTGACTCAGGCCCAAGATTT			
13-IV	169	F	AATGCTCCATTCTTGGCACT	282	LP 1, x = 55 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	170	R	GAAAATTCTGGGGCATTTCTA			
13-V	171	F	GTCTGCTACCACAGGCCATC	247	LP 1, x = 57 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	172	R	GAGGGTGGGATGAAATTTTG			
13-VI	173	F	CTCCTTCCTTCTGCATGTGT	298	LP 1, x = 55 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	174	R	AGAGCCCAGGTGATTGAAGAT			
13-VII	175	F	CTTAGAAGGGAGAGGGAAGGAG	276	LP 1, x = 57 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	176	R	GTAAGCTAAATGGGACGAGCAG			
13-VIII	177	F	GTTCCAACCCATTGTCAGC	250	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	178	R	AGGGACAAAAGGCAGAGACG			
13-IX	179	F	CCATCAGAAGACTGTTGACTGC	251	LP 1, x = 56 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	180	R	AGGTATGGCCAACTATGGA AAA			

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil; wenn nicht anders angegeben wurden die Primer in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt, DMSO wurde nur zugefügt wenn dies vermerkt wurde

Tabelle 5.1.3-2: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse des Kaliumkanals Kv4.3 (*KCNK3*)

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
1-I	181	F	CTTTCCATTGGCCTGTCTTC	296	LP 1, x = 58 °C; 33 Zyklen; 1µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	182	R	TGAGTCTTTTCGATCCCTCTCC			
1-II	183	F	CGAGCTCTGGGAAAGGTCTCT	249	LP 1, x = 53 °C; 35 Zyklen; 1 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	184	R	TTCAGGTCTGGAACCTCAGC			
1-III	185	F	AATAGGATCCGAGATGTTCTGC	281	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	186	R	CCAGGAGCCCTTTCTACAGAC			
2-I	187	F	TCCTGTGTCCCATTCTTACCT	286	LP 1, x = 54 °C; 35 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	188	R	CACTCACGTTGAGGACAATCAG			
2-II	231	F	TCCAAGCTGGTGTGCCTA	300	LP 1, x = 52 °C; 35 Zyklen; 1 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	232	R	ACTCCTTGGTGTCCCTCGTTG			
2-III	191	F	AGGATGAGCTGATTGTCCTCA	295	LP 1, x = 54 °C; 35 Zyklen; 1 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	192	R	TACTCCTCGTAGCAGCAGTCC			
2-IV	193	F	CTACGAGTGCATCTCTGCCTAC	250	LP 1, x = 55 °C; 30 Zyklen;	Disc -Puffer, 10 % T Gele, 15 °C , 85 min 600 V
	194	R	GCCAGTCACGTAGTAGAAGACCA			
2-V	195	F	ACTCGGAGAACAAACCAGGAGT	284	LP 1, x = 55 °C; 30 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	196	R	GAAGAGCCGCAGGAGGTACT			
2-VI	197	F	CTACTCGGTGGCCTTCTTCTG	290	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	198	R	CACAGCTCTTCAGTGTGTAGCC			
2-VII	199	F	GTCTTCCGCGTCTTCAGGAT	274	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen;	Disc -Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	200	R	AACCTCCGTCCTGGTTTCAT			
2-VIII	201	F	TGTGATGTTTTATGCCGAGAAG	297	LP 1, x = 59 °C; 40 Zyklen; 2 µM Primer	Disc Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	202	R	AACTCAATTCCCAGCAAGCTAC			
3-I	203	F	GCAATTGCTGAATGAATGAATG	287	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen; 1 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	204	R	GTCTGAGGCTTACCTTTTGTGC			
3-II	205	F	GTCCCTGTGATTGTTTCCAAC	279	-	-
	206	R	TAATTGAGGGTTTCAGTGCCTTT			
4-I	207	F	GTTGGAGAGAAACAGCCTCATC	299	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	208	R	CCCGGGAAAGAGAAAACAAG			
5-I	209	F	GCCCTTTGACCTTTAGTGGAG	289	LP 1, x = 57 °C; 35 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	210	R	ATCTGAAGGGGACAGACTTTGA			
6-I	211	F	CCGGGATCAAGAGATTGAATG	291	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	212	R	GTGACAGCAGAGGTAGGAGGAG			
7-I	213	F	TTCAAGGTCCAGAACAGAGACA	293	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	214	R	CGAGTAGCTGGCAGGTTAGAAT			
7-II	215	F	CATGGAGAGTTCAATGCAGAAC	282	LP 1, x = 50 °C; 35 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	216	R	CCTCAAGGTTCTCCTAATGCTG			
8-I	217	F	CCTCCTAGTTACCACGAGCAA	247	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	218	R	GCGGAGACCTTGACAACATT			
8-II	227	F	ACATCCCAGATCACCACAGC	298	LP 1, x = 57 °C; 40 Zyklen; 2 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil; wenn nicht anders angegeben wurden die Primer in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt, DMSO wurde immer in einer Konzentration von 5 % zugefügt wenn nicht anders angegeben

Tabelle 5.1.3-3: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse des kardialen Natriumkanals Nav1.5 (SCN5A), Teil 1

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
2	235	F	GGTCTGCCACCCCTGCTCTCT	463	LP 1, x = 63 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 100 min 600 V
	236	R	CCTCTTCCCCCTCTGCTCCATT			
3	237	F	AGTCCAAGGGCTCTGAGCCAA	228	LP 1, x = 52 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 75 min 600 V
	238	R	GGTACTCAGCAGGTATTAAGTGCAA			
4	239	F	GGTAGCACTGGCCTGGCAGTGAT	292	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	240	R	CCTGGACACAAGCCCCCTTC			
5	241	F	TCACACCACGTAAGGAACCTG	304	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	242	R	ATGTGGACTGCAGGGAGGAAGC			
Z5/6	243	F	CAAGGGAGAGGGCTGGTC	235	LP 1, x = 59 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	244	R	GGTGGGAAGACAGAGAGAG			
6	245	F	CCTTCTCTCTGACTGTGTGT	281	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc -Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	246	R	GGTATTCTGGTGACAGGCACATTC			
7	247	F	CCACCTCTGGTTGCCTACACTG	399	LP 1, x = 58 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	SSCP-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 100 min 600 V
	248	R	GTCTGCTGGTCTCACAAAGTCTTC			
8	249	F	CAGAGTGCCCTCACCAGCATG	151	LP 1, x = 57 °C; 40 Zyklen; 0,6 µM Primer; 5 % DMSO	Delect -Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 60 min 600 V
	250	R	GGAGACTCCCCTGGCAGGACAA			
9	251	F	GGGAGACAAGTCCAGCCCAGCAA	262	LP 1, x = 52 °C; 35 Zyklen; 1,4 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	252	R	AGCCCACACTTGCTGTCCCTTG			
10	253	F	ACTTGGAATGCCATAACCCAGA	327	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen	Disc- Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	254	R	CACCTATAGGCACCTACAGTCAG			
11	255	F	AAACGTCCGTTCTCCACTCT	219	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 75 min 600 V
	256	R	AACCACAGCTGGGATTACCATT			
12-I	257	F	GCCAGTGGCACAAAAGACAGGCT	280	LP 1, x = 50 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	258	R	CCTGGGCACTGGTCCGGCGCA			
12-II	259	F	CACCACACATCACTGCTGGTGC	286	LP 1, x = 53°C; 35 Zyklen; 0,8 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	260	R	GGCACTGGTGATCAGTTTGGGAGA			
13	261	F	CCCTTTTCCCCAGGCTGACGCAAA	265	LP 1, x = 53 °C; 35 Zyklen;	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	262	R	GTCTAAAGCAGGCCAAGACAAATG			
14	263	F	CTGGAAGGTATTCCAGTTACATATGA	389	LP 2, x = 50 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	264	R	ACCCATGAAGGCTGTGCCAGCTGC			
15	265	F	CTTTCCATCCCAAACAATTCCT	198	LP 1, x = 50 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 70 min 600 V
	266	R	CCCCACCATCCCCCATGCAGT			
16-I	399	F	GCTTTCAGGCAGGAGCTAGA	223	LP 1, x = 56 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 75 min 600 V
	400	R	CCACAGCAAAGATGAACACG			
16-II	401	F	TGCTAGCCATCATCGTGTTC	366	LP 1, x = 56 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 100 min 600 V
	402	R	GATGGACGGATGGGTAGATG			
17-I	403	F	ATGGTGCAGTGCCTTGGT	285	LP 1, x = 53 °C; 38 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	404	R	GGAGTAGGGGGTGGAAT			
17-II	271	F	GCCCAGGGCCAGCTGCCAGCT	283	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen; 0,3 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	272	R	CTGTATATGTAGGTGCCTTATACATG			
18	401	F	GCCGCTGAGCCTGCGCCAGT	280	LP 1, x = 50 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	402	R	GGAAAGTTGGGCGGCGGCAG			

Tabelle 3: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse des kardialen Natriumkanals Nav1.5 (SCN5A), Teil 2

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
19	275	F	GAGGCCAAAGGCTGCTACTCAG	245	LP 1, x = 50 °C; 35 Zyklen; 1µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	276	R	CCTGTCCCTCTGGGTGGAAC			
20	333	F	GCCATTAGATGTGGGCATT	296	LP 2, x = 55 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	334	R	CCAGCTGGAGACCTCCTTT			
21	279	F	TCCAGGCTTCATGTCCACCTTGCT	270	LP 1, x = 51 °C; 35 Zyklen; 1µM Primer	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	280	R	TCTCCCGACCGGCAATGGG			
22	281	F	AGTGGGGAGCTGTCCCATCCT	216	LP 5, x ₁ – x ₂ = 52-62 °C; x ₃ = 52 °C	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	282	R	GGACCGCTCCCACTCC			
23	283	F	TTGAAAAGGGCATGTGCTCTGGG	415	LP 2, x = 55 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 100 min 600 V
	284	R	ACATCATGGGTGATGGCCAT			
24	285	F	CTCAAGCGAGGTACAGAATTAATGA	202	LP 1, x = 52 °C; 35 Zyklen; 1,4 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 75 min 600 V
	286	R	GGGCTTTCAGATGCAGACACTGAT			
25	287	F	GCCTGTCTGATCTCCCTGTG	270	LP 2, x = 55 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	288	R	AGGTGAGATGGGACCTGGAG			
26	335	F	CTGAGAACCCAGAATGAGG	245	LP 2, x = 55 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	336	R	GACTGTGAAGCGCTCTGAT			
27	291	F	CCCTGCTGAGCACTTTCATTTG	338	LP 1, x = 50 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 95 min 600 V
	292	R	GCTTCTCCGTCCAGCTGACTTGTA			
28-I	293	F	TGCACAGTGATGCTGGCTGGAA	369	LP 1, x = 52 °C; 38 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 95 min 600 V
	294	R	GAAGAGGCACAGCATGCTGTTGG			
28-II	295	F	AAGTGGGAGGCTGGCATCGAC	302	LP 1, x = 57 °C; 35 Zyklen; 0,8 µM Primer	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	296	R	GTGCTCTCCTCCGTGGCCACGC			
28-III	297	F	GAGCCCAGCCGTGGGCATCCT	310	LP 1, x = 60 °C; 38 Zyklen; 0,8 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	298	R	GTCCCCACTCACCATGGGCAG			
28-IV	299	F	CCAACCAGATAAGCCTCATCAACA	306	LP 1, x = 50 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	300	R	CCGCCTGCTGACGGAAGAGGA			
28-V	301	F	TGCTGCAACGCTCTTTGAAGCAT	347	LP 1, x = 50 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 95 min 600 V
	302	R	AAAGGCTGCTTTTCAGTGTGTCCT			
28-VI	303	F	GGACCGTGAGTCCATCGTGTGA	327	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 95 min 600 V
	304	R	AGCCCATTCACAACATATACAGTCT			

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil; die Primer wurden zum Teil aus der Veröffentlichung von Wang *et al.* (1996) übernommen, wenn nicht anders angegeben wurden die Primer in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt, DMSO wurde nur zugefügt wenn dies vermerkt wurde

Tabelle 5.1.3-4: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse des neuronalen Natriumkanals Nav1.1 (*SCN1A*), Teil 1

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
1-I	393	F	GCTCATGTTTCATGACAAGAATTT	247	LP 2, x = 49 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	394	R	GGTTTGGGATTCTTTGCCTTT			
1-II	395	F	GAATCTCTTGCGGCTATTGAA	242	LP 2, x = 53 °C; 38 Zyklen; 0,7 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	396	R	TTAGCAGCAAAATATGCCTGA			
2	397	F	TTCTATGTTGTGTTCTGTCTTACA	240	LP 2, x = 55 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	398	R	AATATGGACATTTCCCAACTTAAT			
3	399	F	GGGCTTTTCAATGTTAGCTTTT	225	LP 4, x ₁ -x ₂ = 46-56 °C; x ₃ = 46 °C; 1,4 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 75 min 600 V
	400	R	CACAGTTTCAAAATCCCAAAATG			
4	401	F	TTTTTGGATGCTTGTTCAG	208	LP 4, x ₁ -x ₂ = 46-56 °C; x ₃ = 46 °C; 1,4 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 75 min 600 V
	402	R	AAGCACTGATGGAAAACCAAA			
5	403	F	CGGTAATCCAGGTAAGAAGTG	241	LP 4, x ₁ -x ₂ = 46-56 °C; x ₃ = 46 °C; 1 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	404	R	ATCACATGATGGGTCCGTCT			
6-I	405	F	TGTGAAGCTTTTATTATTCACACG	249	LP 4, x ₁ -x ₂ = 46-56 °C; x ₃ = 46 °C; 1 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	406	R	TTTTCTATAGTATGTTCTCTCCAAGG			
6-II	407	F	CATGGGCAACCTGAGGAATA	247	LP 4, x ₁ -x ₂ = 48-58 °C; x ₃ = 48 °C; ; 1 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	408	R	GGATATCCAGCCCTCAAGT			
7	409	F	CCTGACCTTCCTGTTCTCATTT	239	LP 4, x ₁ -x ₂ = 48-58 °C; x ₃ = 48 °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	410	R	AGTTGGCTGTTATCTTCAGTTTCT			
8	411	F	TACCAAATCTTTCTGACTAGGCAAT	277	LP 4, x ₁ -x ₂ = 48-58 °C; x ₃ = 48 °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	412	R	ACTTTTACTTAAATGGAGAGTGTGG			
9	413	F	AAAGTACAGGGTGCTATGACCA	362	LP 4, x ₁ -x ₂ = 48-58 °C; x ₃ = 48 °C; 1,4 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	414	R	CATGAGACAGGGCAGCTTTA			
10-I	415	F	GCAAATACTTCAGCCCTTTCA	246	LP 4, x ₁ -x ₂ = 46-56 °C; x ₃ = 46 °C; 1 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	416	R	TCTTTCTCTTCCCCACCAGA			
10-II	417	F	CTGCCTCAGAACATTCCAGA	297	LP 4, x ₁ -x ₂ = 46-56 °C; x ₃ = 46 °C; 1 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	418	R	TGCATCAGTAAACTCAGCAGTG			
11-I	419	F	TGCAAAATGAAATCACATTCAA	241	LP 4, x ₁ -x ₂ = 48-58 °C; x ₃ = 48 °C; 1,4 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	420	R	GGGCACAAACAAGGAATCTCT			
11-II	421	F	AGCACAGCACCTTTGAGGAT	297	LP 4, x ₁ -x ₂ = 49-59 °C; x ₃ = 49 °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	422	R	CCAGCCATGCCTGAACTATT			
12	423	F	TTTGCTTGTCATATTGCTCAAA	247	LP 2, x = 55 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	424	R	TGAGACAATATAAGTTTGGTGAAAA			
13-I	425	F	GGTTGTCTCTGTAACAAAAATGTG	250	LP 4, x ₁ -x ₂ = 48-58 °C; x ₃ = 48 °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	426	R	AAATGGGTCCATCACAACCA			
13-II	427	F	GCCCACCCTGTTGGTATAAA	240	LP 4, x ₁ -x ₂ = 46-56 °C; x ₃ = 46 °C; 1,4 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	428	R	CACATTTACCTTCCAATATGCTT			
14	429	F	TGTCATGTATGTTATTATCTGGTGGA	295	LP 4, x ₁ -x ₂ = 48-58 °C; x ₃ = 48 °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	430	R	ATTGCTATGCAAGAACCCTGA			
15-I	431	F	TGACCATTTCTAGGTAAAGCTCAAT	275	LP 4, x ₁ -x ₂ = 48-58 °C; x ₃ = 48 °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	432	R	GTTGACAATCACTGGCGATCT			
15-II	433	F	CAGCTCTTTGGTAAAAGCTACAAA	250	LP 4, x ₁ -x ₂ = 46-56 °C; x ₃ = 46 °C; 1,4 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	434	R	TCCAAAATGCATATCTTAAGTGG			

Tabelle 4: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse des neuronalen Natriumkanals Nav1.1 (*SCN1A*), Teil 2

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
16-I	435	F	GCTCTTCCTACATTGGTGTA	299	LP 4, $x_1 - x_2 = 48-58$ °C; $x_3 = 48$ °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	436	R	GATTGGACATACTGCTTTCTT			
16-II	437	F	TCAACAGTCCTTCATTAGGAAACA	363	LP 4, $x_1 - x_2 = 48-58$ °C; $x_3 = 48$ °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	438	R	TGTATTCATACCTTCCCACACCT			
17	439	F	TGGCAGGCAACTTATTACCA	231	LP 4, $x_1 - x_2 = 48-58$ °C; $x_3 = 48$ °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	440	R	ACAAGCTGCACTCCAAATGA			
18	441	F	CAAGACAAGGACATTGCTAAAGG	241	LP 4, $x_1 - x_2 = 46-56$ °C; $x_3 = 46$ °C; 1,4 µM Primer; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	442	R	TCTCACTCACCAGAGCACCA			
19	443	F	CTGCCCTCCTATTCCAATGA	327	LP 4, $x_1 - x_2 = 45-55$ °C; $x_3 = 45$ °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	444	R	GACAAGCTACCTTGAACAGAGACA			
20	445	F	TTGTTATTATTTTGTGTGTGCAG	249	LP 2, $x = 55$ °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	446	R	AATTTGCCATTCTTTTGCAT			
21-I	447	F	AATGCTTCTCCCTCCCTTTT	378	LP 4, $x_1 - x_2 = 46-56$ °C; $x_3 = 46$ °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 95 min 600 V
	448	R	TAGAATTTGCCAGCAAACAA			
21-II	449	F	TCAGCATCATGGGCGTAAAT	360	LP 4, $x_1 - x_2 = 46-56$ °C; $x_3 = 46$ °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	450	R	CACCCATCTGGGCTCATAAA			
22-I	451	F	CCCATGTGTGGCATTGTGA	211	LP 4, $x_1 - x_2 = 46-56$ °C; $x_3 = 46$ °C; 1 µM Primer	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 75 min 600 V
	452	R	CACAGATTTGGACCAAGACA			
22-II	453	F	TGTGTTCTAGAAATGAAAAGCCATA	297	LP 4, $x_1 - x_2 = 46-56$ °C; $x_3 = 46$ °C; 1 µM Primer	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	454	R	CGATTAATTTTACCACCTGATCAAT			
23	455	F	TTTTACAAAATATTCCCTTTGG	245	LP 4, $x_1 - x_2 = 46-56$ °C; $x_3 = 46$ °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	456	R	TCAAGTACTCATTTGGCAGAGAA			
24	457	F	GGACACAGTTTAAACCAGTTGA	211	LP 4, $x_1 - x_2 = 45-55$ °C; $x_3 = 45$ °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 75 min 600 V
	458	R	TTTTGTGAGACAAGCATGCAA			
25	459	F	TCCTTTGTTGTTAAAAGCATTTCT	300	LP 4, $x_1 - x_2 = 46-56$ °C; $x_3 = 46$ °C; 1 µM Primer	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	460	R	GGAGAGAATGACAACCACAAAAT			
26	461	F	AACGCATGATTCTTCACTGG	231	LP 4, $x_1 - x_2 = 46-56$ °C; $x_3 = 46$ °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	462	R	AGGAAGAGTAGGAGGCCGATG			

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil; wenn nicht anders angegeben wurden die Primer in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt, DMSO wurde nur zugefügt wenn dies vermerkt wurde

Tabelle 5.1.3-5: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse der Promoterregion des kardialen Natriumkanals Nav1.5 (SCN5A)

Region	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
1	371	F	CAGCGTATGTCTCCGTGTGT	351	LP 7, x = 55 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	372	R	CGAACCACACTTTCCTGGAG			
2	373	F	CGTCCGTGTGTTCAGGTAGA	249	LP 7, x = 48 °C; 40 Zyklen; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	374	R	ACATGCACCCTGAGACAGAT			
3	375	F	TCTGTGTCTGTGTGGGTGTG	249	LP 5, x ₁ - x ₂ = 55-65 °C; x ₃ = 55 °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	376	R	GCGGACAGGCTCACATTAAC			
4	377	F	GTCAGTGTATGCCCCGTGTCC	249	LP 7, x = 55 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	378	R	GCTCACAGCCACAGACAGC			
5	379	F	GTGGGTGTCTGGTAGCCTTC	243	LP 7, x = 52 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	380	R	CGCACACTCCCACACTGA			
6	381	F	GCTGTCTGTGGCTGTGAGC	266	LP 7, x = 55 °C; 40 Zyklen; 5 % DMSO; 1 µM Primer	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	382	R	CGATCCCTGCATCCTACG			
7	383	F	GGTCAGTGTGGGAGTGTGC	266	LP 7, x = 55 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	384	R	CGATCCCTGCATCCTACG			
8	385	F	CCGGGTCAGTGTGGGAGT	389	LP 7, x = 48 °C; 40 Zyklen; 5 % DMSO; 1 µM Primer	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 95 min 600 V
	386	R	GCACTCGCTCACCTGCTG			
9	387	F	CGTAGGATGCAGGGATCG	289	LP 5, x ₁ - x ₂ = 55-65 °C; x ₃ = 55 °C	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	388	R	TCTCTGGGGCACTGATCG			
10	389	F	ACCAGCAGGTGAGCGAGT	279	LP 7, x = 57 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	390	R	GAAACCCGGAAGGAAAGG			
11	391	F	CGATCAGTGCCCCAGAGA	228	LP 7, x = 57 °C; 35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 70 min 600 V
	392	R	GTATCCGGGTCCCAATCC			

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil; die Primer wurden zum Teil aus der Veröffentlichung von Yang *et al.* (2004) übernommen, wenn nicht anders angegeben wurden die Primer in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt, DMSO wurde nur zugefügt wenn dies vermerkt wurde

Tabelle 5.1.3-6: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse der Natriumkanal β-Untereinheit SCN2B

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
1	345	F	CAAGCCGGCCATATTAGAGA	294	LP 2, x = 50 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	346	R	CATTGCGGCTACACTTCTGA			
2	347	F	GCCCTTTCAGCCAGACTC	266	LP 2, x = 49 °C; 38 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	348	R	ATGCCATGGGGCTCCTAC			
3	349	F	CTCATCCAGCCACCCATC	300	LP 2, x = 54 °C; 42 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	350	R	AGGTGGGTGGGAAAGGTC			
4	351	F	CAGCCCTGGTGCTCAGTG	295	LP 2, x = 50 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	352	R	CTGTACAGGGCGGAGAGG			

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil, die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt, DMSO wurde nur zugefügt wenn dies vermerkt wurde

Tabelle 5.1.3-7: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse des Kaliumkanals hERG (*KCNH2*)

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
1-I	43	F	GGGCCACCCGAAGCCTAGT	298	-	
	44	R	CCGTCCCCCTCGCCAAAGC			
1-II	45	F	CCGCCCATGGGCTCAGG	162	-	
	46	R	CATCCACACTCGGAAGAGCT			
2	47	F	GGTCCCGTCACGCGCACTCT	312	LP 2, x = 52.5 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	48	R	TTGACCCCGCCCCTGGTCGT			
3	49	F	GGGCTATGTCTCCCACTCT	213	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	50	R	AGCCTGCCCTAAAGCAAGTACA			
Z3/4-I	51	F	GGACACATAGGGGTGGAATG	194	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	52	R	GCTTCCTACTGAGGGGAGGA			
Z3/4-I	53	F	AGTGACATGACGCTTTGTG	173	LP 2, x = 59°C; 30 Zyklen; 10 % DMSO	
	54	R	TGACCTCGAGTCTCAAAAATCA			
4-I	55	F	CTCCGGGGCTGCTCGGAT	284	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	56	R	CACCAGCGCACGCCGCTCCT			
4-II	57	F	GCCATGGACAACCACGTGGCA	339	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	58	R	CCCAGAATGCAGCAAGCCTG			
5	59	F	GGCCTGACCACGCTGCCTCT	293	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	60	R	CCCTCTCCAAGCTCCTCCAA			
1b	61	F	GGTGCAGGTGAGGCAGTGG	216	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	62	R	CGGCCCCAGAAAAGAGAGGAA			
6-I	63	F	CAGAGATGTCATCGCTCCTG	295	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	64	R	CAGGCGTAGCCACACTCGGTAG			
6-II	65	F	TTCCTGCTGAAGGAGACGGAAG	296	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	
	66	R	TACACCACCTGCCTCCTTGCTGA			
7-I	67	F	TGCCCCATCAACGGAATGTGC	333	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	68	R	GAAGTAGAGCGCCGTCACATAC			
7-II	69	F	GCCTGGGCGGCCCTCCATCAA	210	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	70	R	AGTTTCCTCCAACCTTGGGTTC			
8	71	F	GCAGAGGCTGACGGCCCCA	321	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	72	R	ACTTGTTTGCTGTGCCAAGAG			
9	73	F	ATGGTGGAGTGGAGTGTGGGTT	390	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	74	R	AGAAGGCTCGCACCTCTTGAG			
10	75	F	GAGAGGTGCCTGCTGCCTGG	307	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	76	R	ACAGCTGGAAGCAGGAGGATG			
11	77	F	GGGCCCTGATACTGATTTTG	372	LP 2, x = 61,5 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	78	R	GCCCTGTGAAGTCCAAAAAGC			
	79	F	CCCTGATACTGATTTTGGTT	193	nested PCR, PCR 1: LP 2 x = 56 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	80	R	CACCCCGCCTTCCAGCTCC		PCR 2: LP 2 x = 58 °C; 35 Zyklen	
12	81	F	TGAGGCCCCATTCTCTGTTTC	358	-	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	82	R	GTAGACGCACCACCGCTGCCA			
13	83	F	CTCACCACGCTCTGCTCTCTG	273	LP 2, x = 59 °C; 40 Zyklen 8 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	84	R	CACCAGGACCTGGACCAGACT			
14	85	F	GTGGAGGCTGTCACTGGTGT	258	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	86	R	GAGGAAGCAGGCTGGAGCTT			
15	87	F	TGCCCATGCTCTGTGTGTATTG	232	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen; 1 µM Primer	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	88	R	CGGCCCAGCAGCGCCTTGATC			

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil; die Primer wurden zum Teil aus der Veröffentlichung von Splawski *et al.* (1998) übernommen, wenn nicht anders angegeben wurden die Primer in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt, DMSO wurde nur zugefügt wenn dies vermerkt wurde

Tabelle 5.1.3-8: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse des Kaliumkanals KvLQT1 (*KCNQ1*)

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
1-I	89	F	CTCGCCTTCGCTGCAGCTC	334	LP 2, x = 59 °C; 35 Zyklen; 10 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	90	R	GCGCGGGTCTAGGCTCACC			
1-II	91	F	CGCCGCGCCCCAGTTGC	224	LP 2, x = 61 °C; 38 Zyklen; 10 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	92	R	CAGAGCTCCCCACACCAG			
5bp1	93	F	AAAGAGCCTGTGCTTCCTGA	150	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 60 min 600 V
	94	R	CCAGCTGTCCACCCATCTAC			
Z1/2	95	F	TGATGCTTTCAGACTGACAAAAC	201	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 70 min 600 V
	96	R	AAGGGGTGCCCTTAGAACTC			
2-I	97	F	ATGGGCAGAGGCCGTGATGCTGAC	165	LP 6, x ₁ = 64 °C; x ₂ = 62 °C ;35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 60 min 600 V
	98	R	ATCCAGCCATGCCCTCAGATGC			
3-I	99	F	GTTCAAACAGGTTGCAGGGTCTGA	256	LP 6, x ₁ = 65 °C; x ₂ = 63 °C ;35 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	100	R	CTTCCTGGTCTGGAAACCTGG			
4-I	101	F	CTCTCCCTGGGGCCTGGC	170	LP 6, x ₁ = 65 °C; x ₂ = 63 °C ;35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 65 min 600 V
	102	R	TGCGGGGGAGCTTGTGGCACAG			
5-I	103	F	TCAGCCCCACACCATCTCCTTC	154	LP 6, x ₁ = 65 °C; x ₂ = 63 °C ;35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 60 min 600 V
	104	R	CTGGGCCCCCTACCCTAACCC			
6-I	105	F	TCCTGGAGCCCGACACTGTGTGT	238	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	106	R	TGTCCTGCCCCACTCCTCAGCCT			
7-I	107	F	TGGCTGACCACTGTCCCTCT	195	LP 6, x ₁ = 64 °C; x ₂ = 62 °C ;30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 70 min 600 V
	108	R	CCCCAGGACCCAGCTGTCCAA			
8-I	109	F	GCTGGCAGTGGCCTGTGTGTGGA	191	LP 6, x ₁ = 64 °C; x ₂ = 62 °C ;30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 70 min 600 V
	110	R	AACAGTGACCAAAATGACAGTGAC			
9-I	111	F	TGGCTCAGCAGGTGACAGC	185	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 70 min 600 V
	112	R	TGGTGGCAGGTGGGCTACT			
10-I	113	F	GCCTGGCAGACGATGTCCA	216	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 75 min 600 V
	114	R	CAACTGCCTGAGGGGTTCT			
11-I	115	F	CTGTCCCCACACTTTCTCCT	195	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 70 min 600 V
	116	R	TGAGCTCCAGTCCCCTCCAG			
12-I	117	F	TGGCCACTCACAATCTCCT	222	LP 2, x = 58 °C; 30 Zyklen	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 75 min 600 V
	118	R	GCCTTGACACCCTCCACTA			
13-I	119	F	GGCACAGGGAGGAGGAAGTG	216	LP 2, x = 56 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, , 75 min 600 V
	120	R	CGGCACCGCTGATCATGCA			
14-I	121	F	CCAGGGCCAGGTGTGACTG	119	LP 2, x = 56 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 60 min 600 V
	122	R	TGGGCCCAGAGTAACTGACA			
15-I	123	F	GGCCCTGATTGGGTGTTTTA	135	LP 2, x = 56 °C; 35 Zyklen	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 60 min 600 V
	124	R	GGACGCTAACCAAGAACAC			
16-I	125	F	CACCACTGACTCTCTCGTCT	297	-	
	126	R	CCATCCCCCAGCCCCATC			

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil; die Primer wurden zum Teil aus der Veröffentlichung von Splawski *et al.* (1998) übernommen, wenn nicht anders angegeben wurden die Primer in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt, DMSO wurde nur zugefügt wenn dies vermerkt wurde

Tabelle 5.1.3-9: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse des Kaliumkanals Kir2.1 (*KCNJ2*)

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
1-I	29	F	GGACCGCCTCAAAAAGAGC	260	LP 3, x = 55 °C; 38 Zyklen; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	30	R	GTCCATTCCCCAGGACACAC			
2-I	31	F	GTCTTCACCGAACATTCAAAA	339	LP 3, x = 55 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	32	R	CCAGCGAATGTCCACACAC			
2-II	33	F	TGGCCACTGTAATGTTCAAGTTC	320	LP 3, x = 55 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	34	R	CAGCAATTGGGCATTTCATC			
2-III	35	F	CACGGCTGCCTTCCTCTT	325	LP 3, x = 55 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	36	R	AGTAATTCTGGATTTGAGGAGCTG			
2-IV	37	F	AGTGGGCAATCTTCGGAAA	312	LP 3, x = 55 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	38	R	GCTAGATAAGAGCTACGGCACTG			
2-V	39	F	GCAGACTTTGAAATCGTGGTC	311	LP 3, x = 55 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	40	R	CCATTTTCACTGTCGTCTTCC			
2-VI	41	F	TGCCAGAGACTTAGCAGAAAAG	282	LP 3, x = 55 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Delect-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 85 min 600 V
	42	R	AACTGTTTGGGCCTCTGAC			

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil; wenn nicht anders angegeben wurden die Primer in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt, DMSO wurde nur zugefügt wenn dies vermerkt wurde

Tabelle 5.1.3-10: Primer, PCR- und SSCP-Bedingungen für die PCR-basierte SSCP-Analyse des Kaliumkanals TASK1

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen	SSCP-Bedingungen
1-I	19	F	TGAAGGGACAGCTCCGCGGCG	273	LP 8, x = 61 °C; 40 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 80 min 600 V
	20	R	CGACTCCAGCGCGTCGAAGACCG			
1-II	25	F	GGACGATGAAGCGCAGAACGTG	332	LP 8, x = 55 °C; 45 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	26	R	GCGCCCAGCCCTGGGTTCC			
2-I	5	F	AGCCCCAAAATGTGTGCTT	326	LP 1, x = 52 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	6	R	TGGAAGAAGGTCCAGTGCTC			
2-II	17	F	CTCATCGGCTTCTTCTCGTGCATCA	325	LP 1, x = 58 °C; 35 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	18	R	GCCCGTTGCGCGTGAGCAG			
2-III	9	F	CCTCAACCTCGTGGTGCT	323	LP 1, x = 53 °C; 37 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	10	R	ACGAGTGGCTCTGCTCCA			
2-IV	11	F	GCAGTACTCCATCCCCATGA	319	LP 1, x = 53 °C; 40 Zyklen; 5 % DMSO	Disc-Puffer, 10 % T Gele, 15 °C, 90 min 600 V
	12	R	GGTCCCACTGGGCAGAA			

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil; wenn nicht anders angegeben wurden die Primer in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt, DMSO wurde nur zugefügt wenn dies vermerkt wurde

Tabelle 5.1.3-11: PCR-Bedingungen für die Sequenzierung des Kaliumkanals Kir2.4

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen
2-I	339	F	TCTGCCGGTTTCTTGTC	471	LP 2, x = 55 °C; 35 Zyklen
	340	R	GCCACGTGTGAGAAGCAG		
2-II	341	F	TGGCCTTCTGGCTCATTG	554	LP 2, x = 55 °C; 35 Zyklen
	342	R	CTGCCCAGTGACCCATTG		
3-I	343	F	TGCTCCCTGCTGTCTTTG	700	LP 2, x = 55 °C; 35 Zyklen
	344	R	CCATCCCTCCATCTTGCT		

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil, die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt

Tabelle 5.1.3-12: PCR-Bedingungen für die Sequenzierung des Kaliumkanals Kir6.1 (*KCNJ8*)

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen
2-I	321	F	TAAATGTTTCCCTCGTGCAG	687	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen
	322	R	GGACTGAAGCTCAGGTTTTCA		
3-I	323	F	TTGGCTAGTCTTTCTGCAAGC	568	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen
	324	R	TTGTCAATCACGTGGCAGAT		
3-II	325	F	TGATAACCCAATCGAGAGCA	600	LP 1, x = 55 °C; 35 Zyklen, 5 % DMSO
	326	R	TCTGGTTCAGTCTGGCAGTG		

Tabelle 5.1.3-13: PCR-Bedingungen für die Sequenzierung der akzessorischen Untereinheit *KCNE1* (minK)

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen
2-I	337	F	TAAGAGGTGTGCCTGGGAAG	583	LP 7, x = 55 °C; 38 Zyklen
	338	R	TCATTAATCCACCCCTCACC		

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil, die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt

Tabelle 5.1.3-14: PCR-Bedingungen für die Sequenzierung des Kaliumkanals TASK1

Exon	Primer-No.	Orientierung	Primer Sequenz 5'→3'	Größe in bp	PCR-Bedingungen
1-I	305	F	GGCGGTGGGTGGTGCTGAA	550	LP 5, x ₁ – x ₂ = 55-65 °C; x ₃ = 55 °C
	306	R	GCCGGCCCCGGACGACT		
2-I	307	F	ACGGGGAGGGAGAAGAAGGTTT	495	LP 5, x ₁ – x ₂ = 52-62 °C; x ₃ = 52 °C
	308	R	CCGTGAGGCCCGTAAGGATGTAGA		
2-II	309	F	CCTGGGCGAGCGCATCAACA	781	LP 4, x ₁ – x ₂ = 52-62 °C; x ₃ = 52 °C
	310	R	GAGGCCGCGGAAGGTGGACAG		
2-III	311	F	AGGGGGCGGCCGCTACAGC	268	LP 5, x ₁ – x ₂ = 52-62 °C; x ₃ = 52 °C
	312	R	TGGGGGAGAGTGGTGAGGGATGTT		

F = forward; R = reverse; LP = Laufprofil, wenn nicht anders angegeben wurden die Primer in einer Endkonzentration von 0.5 µM eingesetzt